

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Deregulation von Zellzyklus und Apoptose beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dilek Güner
aus Eskisehir (Türkei)

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

PD Dr. med. Peter Daniel

Prof. Dr. rer. nat. Klaus Schulze-Osthoff

Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg

Datum der Promotion: 15. September 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 DAS ÖSOPHAGUSKARZINOM	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Pathogenese und Pathologie	10
1.1.3 Diagnose und Stadieneinteilung	12
1.1.4 Therapie und klinische Prognose	15
1.1.5 Operative Therapie	17
1.1.6 Präoperative (neoadjuvante) Therapie	18
1.1.7 Postoperative (adjuvante) Therapie	19
1.1.8 Definitive Radiotherapie	19
1.1.9 Palliative Radiotherapie	20
1.2 TUMORBIOLOGIE UND MOLEKULARE PROGNOSEFAKTOREN	20
1.2.1 Zellvermehrung	22
1.2.2 Der G1-Restriktionspunkt und Zellzyklusregulation durch den Rb-Signalweg	22
1.2.3 Zellzyklus-Hemmung durch die Retinoblastom (Rb) Genfamilie	23
1.2.4 Zellzyklus-Regulation durch Cycline, CDK und ihre Inhibitoren	25
1.2.5 Zellzyklus und Apoptose	28
1.2.6 Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose durch p53	32
1.2.7 Inaktivierung von Zellzyklusregulatoren in Tumoren	34
1.2.8 Zelltodsignalwege	36
1.2.9 Mitochondrien und Apoptose	38
2. FRAGESTELLUNG	42
3. PATIENTEN UND METHODEN	43
3.1 PATIENTEN	43
3.2 IMMUNHISTOCHEMIE	44
3.3 EXTRAKTION GENOMISCHER DNA AUS TUMORPROBEN	46
3.4 p53 MUTATIONSANALYSE	47
3.5 K-RAS MUTATIONSANALYSE	48
3.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	49
4. ERGEBNISSE	52
4.1 NACHBEOBACHTUNG	52
4.2 ANALYSE DES RB-SIGNALWEGS	52
4.3 MUTATIONSANALYSE VON p53 UND BAX IN RELATION ZU PROTEIN-EXPRESSIONSPROFILIEN	55
4.4 KORRELATION VON EXPRESSIONSPROFILIEN MIT KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN PARAMETERN	57
4.5 EINFLUSS VON CYCLIN D1, p16 ^{INK4A} , RB, p53, p21, BAX UND BCL-2 AUF DAS ÜBERLEBEN	59

4.6	MULTIVARIATE REGRESSIONSANALYSE FÜR DAS GESAMTÜBERLEBEN	66
4.7	ANALYSE DES SPÄTEN G1-RESTRIKTIONSPUNKTS (CYCLIN E UND p27 ^{KIP})	69
4.8	DEREGULATION VON ZELLZYKLUSKOMPONENTEN UND TUMORPROLIFERATION	74
4.9	K-RAS MUTATION UND INAKTIVIERUNG VON SIGNALWEGEN.....	76
5.	DISKUSSION	80
5.1	MOLEKULARE PROGNOSEFAKTOREN DES ÖSOPHAGUSKARZINOMS	82
5.2	ROLLE CHROMOSOMALER VERÄNDERUNGEN	83
5.3	MARKER FÜR TUMORPROLIFERATION UND DEREN PROGNOSTISCHE RELEVANZ.....	85
5.4	INAKTIVIERUNG DES RB-SIGNALWEGS UND PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG	86
5.5	STÖRUNG DES SPÄTEN G1-RESTRIKTIONSPUNKTS	88
5.6	PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER INAKTIVIERUNG VON KOMPONENTEN DES p53-SIGNALWEGS	89
5.7	INAKTIVIERUNG VON KONTROLLGENEN UND MECHANISMUS DER KARZINOGENESE	91
5.8	ONKOGENE TRANSFORMATION UND INAKTIVIERUNG VON SIGNALWEGEN.....	92
6.	ZUSAMMENFASSUNG	94
7.	LITERATUR	95
8.	PUBLIKATIONEN	119
9.	DANKSAGUNG	120
10.	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	121

1. Einleitung

1.1 Das Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom ist ein sehr aggressiver Tumor und hat nach wie vor, trotz Fortschritten in der Chirurgie und Einsatz aggressiver multimodaler Therapiekonzepte, eine schlechte Prognose. Zum heutigen Stand der Forschung akzeptierte Therapie der Wahl ist die Operation und eventuell anschließend Radiotherapie, wenn möglich in Form einer kombinierten Radiochemotherapie^{1, 2}. Leider haben die bisherigen Therapiekonzepte die Prognose (und damit das Gesamtüberleben) jedoch nicht wesentlich verbessern können. Die meisten Patienten befinden sich bei Erstdiagnose bereits schon in einem fortgeschrittenem Stadium. Abgesehen vom hohen Risiko eines operativen Eingriffes liegt die 2 Jahres-Überlebensrate auch bei optimaler Therapie nur bei ca 20%³.

Ziel dieser Arbeit ist daher, über Bestimmung von molekularen Markern die Aggressivität der Tumoren individuell zu bestimmen, um zukünftig die Therapie für jeden Patienten durch Eskalation bzw. De-Eskalation optimieren und damit das Überleben signifikant verbessern bzw. unnötige Therapien vermeiden zu können.

1.1.1 Epidemiologie

In der Bundesrepublik ist die Inzidenz mit 4-5 Neuerkrankungen eines Ösophaguskarzinoms pro 100.000 Einwohner pro Jahr eher niedrig. Für das Jahr 2000 betrug die altersstandardisierte Inzidenz für sämtliche Ösophaguskarzinome im Saarland, dem einzigen Bundesland zuverlässig geführten Krebsregister in West-Deutschland, 10,47 für Männer und 2,19 Neuerkrankungen für Frauen pro 100000 Einwohner, 1997 betrug die altersstandardisierte Inzidenz 11,0 für Männer und 2,3 für Frauen, die altersstandardisierte Mortalität betrug 1997 pro 100000 Einwohner 10,3 für Männer und 1,0 für Frauen (**Tab. 1**; Quelle: Krebsregister des Saarlands: www.krebsregister.saarland.de). In einigen Regionen Chinas, der ehemaligen Sowjetunion, in Südafrika und im Iran ist die Inzidenz hingegen hoch (100-500 Plattenepithelkarzinome pro 100000 Einwohner pro Jahr).

Tab. 1: Standardisierte und kumulative Mortalitätsraten für das Ösophaguskarzinom 1997

Standardisierte und Kumulative Mortalitätsraten für das Ösophaguskarzinom (ICD9: 150) im Saarland 1997							
Rohe Mortalität*		Mortalität standardisiert nach Altersstruktur für WHO „Standardbevölkerungen“**			Kumulative Mortalität***		
		Welt	Europa	BRD	0-14 Jahre	35-64 Jahre	0-74 Jahre
Frauen	1,3	0,6	0,8	1,0	-	0,03	0,07
Männer	9,7	5,7	8,4	10,3	-	0,34	0,64

*Rohe Mortalität: Zahl aller Neuerkrankungen einer oder aller Lokalisationen pro 100 000 der Bevölkerung unter Risiko in einem bestimmten Zeitraum. Als Zeitraum wird normalerweise das Kalenderjahr verwendet.

**Standardisierte Mortalität: Man erzeugt Vergleichszahlen, die um den Einfluss abweichender Altersstrukturen auf die Krebshäufigkeit bereinigt sind. Für einen Gesamtüberblick ist die Vielzahl der altersspezifischen Raten zu unübersichtlich. Hierfür wird die standardisierte Mortalität genutzt. Man erzeugt Vergleichszahlen, die um den Einfluss abweichender Altersstrukturen auf die Krebshäufigkeit bereinigt sind. Für die Altersstandardisierung wurden von der WHO verschiedene Modellbevölkerungen (Standardbevölkerungen) entwickelt, die den Berechnungen zugrunde liegen. "Altersspezifische" Mortalität: Krebsneuerkrankungen in einer bestimmten Altersklasse auf die Zahl der Angehörigen dieser Altersgruppe in der "Bevölkerung unter Risiko".

***Ein Näherungswert für das Risiko (Nettorisiko) oder die Wahrscheinlichkeit eines Individuums, bis zu einem bestimmten Lebensalter an Krebs zu versterben ist die sogenannte "kumulative Mortalitätsrate". Die Summationsgrenzen sind dabei je nach Fragestellung variabel. Man errechnet üblicherweise die Werte für die Altersklassen 0-74 Jahre, 35-64 Jahre, 0-14 Jahre.

Um die Einschätzung der Relation dieser Zahlen zu gestatten zeigt **Abbildung 1** die altersstandardisierten häufigsten Mortalitätsraten für Männer und Frauen für das Jahr 1998 im Saarland.

Im Jahr 1997 betrug die Anzahl bösartiger Neubildungen insgesamt 2787 Erkrankungen bei Männern und 2738 bei Frauen im Saarland. Hiervon entfielen auf Ösophaguskarzinome (ICD Ziffer 150 nach ICD9): 59 Männer (2,1%) und 16 Frauen (0,58%). Somit ist das Ösophaguskarzinom der 9.-häufigste Tumor bei Männern, nimmt jedoch nur Platz 23 bei Frauen ein. Der prozentuale Anteil des Ösophaguskarzinoms an Gastrointestinaltumoren

(Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm, Rektum) insgesamt beträgt 59/544 (10,8 %) für Männer und 16/505 (3,2 %) für Frauen.

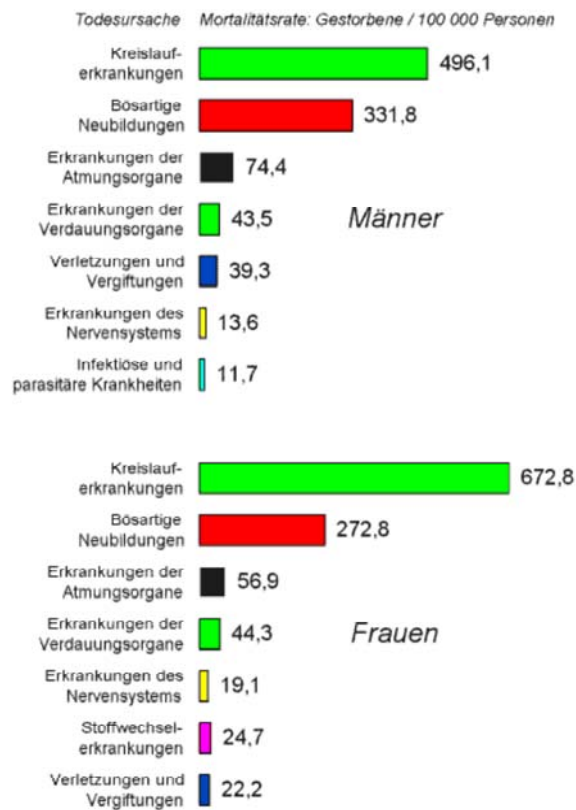


Abb. 1: Altersstandardisierte häufigste Mortalitätsraten für Männer und Frauen für das Jahr 1998 im Saarland.

Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom unterscheiden sich epidemiologisch und ätiologisch. Plattenepithelkarzinome des Ösophagus gehen bis zu 10% mit einem Zweitkarzinom überwiegend im Hals-Nasen-Ohren-Bereich oder der Lunge einher. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom ist das Adenokarzinom eine Erkrankung der westlichen Welt. Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 65 Jahren und somit 10 Jahre über dem der Patienten mit Plattenepithelkarzinom. Männer sind 7-mal häufiger betroffen. Auffällig ist, daß das Adenokarzinom des Ösophagus in den letzten Jahrzehnten an Häufigkeit zunimmt. Die Ursache hierfür ist noch unklar, liegt aber möglicherweise in der besseren Früherkennung. Diskutiert werden muss aber auch eine veränderte Sichtweise der Pathologen

und einige dieser jetzt als Adenokarzinome des Ösophagus betrachteten Tumore sind möglicherweise früher als Magenkarzinome der Cardia klassifiziert worden. Dies vermag auch die regional verschiedenen Häufigkeiten des Adenokarzinoms unabhängig von pathogenetischen Einflüssen (s.u.) zumindest teilweise zu erklären.

Prozentuale Anteile der häufigsten Krebslokalisationen an der Gesamtzahl 1997 im Saarland

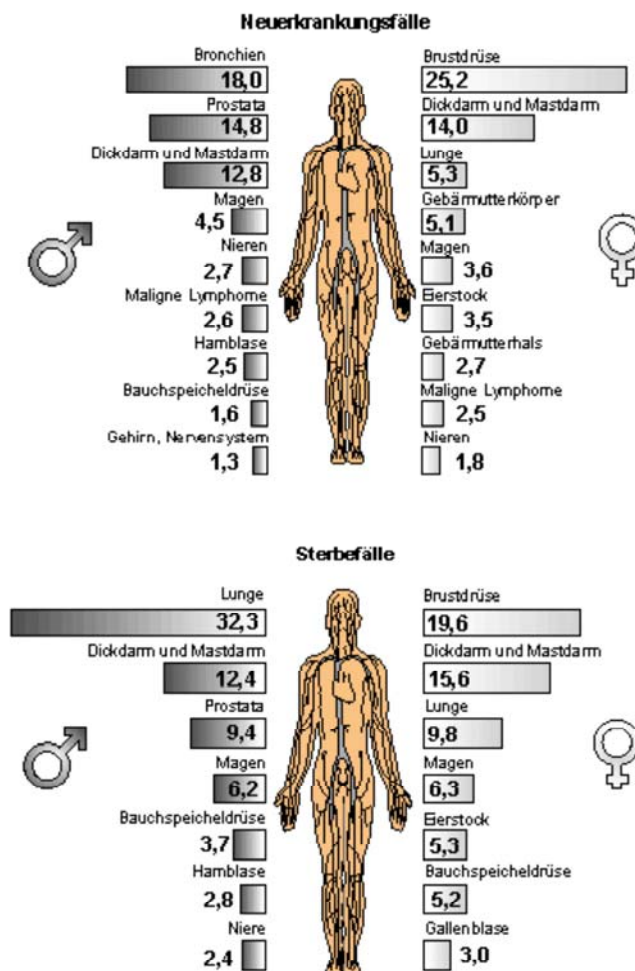


Abb. 2: Prozentuale Anteile der häufigsten Lokalisationen maligner Tumore für das Jahr 1997 im Saarland.

Neuerkrankungen Ösophaguskarzinom (nicht grafisch dargestellt): Platz 9 bei Männern (2,1 %), Platz 23 bei Frauen (0,58 %).

Auffällig ist, dass es Regionen mit deutlich erhöhter Inzidenz des Ösophaguskarzinoms gibt. Hohe Inzidenzen wurden zwischen 1988 und 1992 berichtet für die Calvados-Gegend in Frankreich mit 22,3/100.000 Neuerkrankungen/Jahr, Hong-Kong und Japan. Die niedrigste Inzidenz wurde mit 1,7/100.000 in Israel berichtet ⁴⁻⁸. Die weltweit höchsten Inzidenzen werden allerdings in Regionen Chinas und im Iran beobachtet. Dort wird in einigen Regionen eine Inzidenz von bis zu 300 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr beobachtet. Insgesamt lag die landesweite Inzidenz in China aber bei 18,8/100.000 zwischen 1973 bis 1975 und fiel zwischen 1990 bis 1992 auf 17,4/100.000 ab, vermutlich aufgrund veränderter Ernährung und verbesserter Nahrungshygiene. Die höchsten Inzidenzen werden in der Linxian und der Nanao Region, sowie Shanghai beobachtet ⁹⁻¹². Im Iran finden sich die höchsten Inzidenzen im Norden und Nordosten des Landes im Gebiet der Turkomanen mit Inzidenzen bis 144/100.000 für Männer und 48/100.000 für Frauen und prozentualen Anteilen von bis zu 9% aller Tumoren ¹³⁻¹⁶. Die Ursachen für diese Unterschiede in der Inzidenz sind unklar. Neben Karzinogenexposition ^{17, 18} werden genetische Unterschiede oder infektiöse Ursachen wie die Infektion mit onkogenen humanen Papillomviren ¹⁹ als Ursache für die regionalen Unterschiede diskutiert.

Insbesondere Karzinogenexposition über die Nahrung ^{15, 20-23}, Alkohol- ^{18, 20} und Nikotinabusus ¹⁷, aber auch thermische Irritation ¹⁶ werden als auslösende Faktoren für Plattenepithelkarzinome diskutiert, letztere allerdings kontrovers ²⁴. Hingegen ist die intestinale Metaplasie des Barrett-Ösophagus mit einer erhöhten Rate von Adenokarzinomen des Ösophagus assoziiert ²⁵⁻²⁷. Im Einklang mit diesen Befunden ist, dass Faktoren, die mit Refluxkrankheit assoziiert sind, sowohl als Risikofaktoren für Barrett-Ösophagus als auch für Adenokarzinome identifiziert werden konnten. Vor allem Übergewicht ²⁸ und Behandlung mit Medikamenten, die den Sphinktertonus der Cardia herabsetzen, z.B. Asthmamedikamente, Nitroglycerin und Benzodiazepine ²⁹. Zusätzlich wurde die Behandlung mit H2-Blockern mit dem Auftreten von Adenokarzinomen des Ösophagus in Verbindung gebracht ³⁰.

1.1.2 Pathogenese und Pathologie

Wie bereits erwähnt gelten exogene Noxen wie Alkoholabusus, Rauchen und nitrosaminhaltige Nahrungsmittel als wahrscheinliche Ursachen. Weitere Auslöser sind chronische Entzündungen, z.B. in Folge gastrointestinalen Refluxes, der vor allem die

Entstehung einer intestinalen Metaplasie und somit von Adenokarzinomen begünstigt. Allerdings scheinen bei einem Teil der Patienten auch onkogene Viren an der Pathogenese beteiligt zu sein.

Der erste Bericht, der eine Beteiligung humaner Papillomviren (HPV) an der Entstehung sowohl benigner als auch maligner Tumoren des Plattenepithels des Ösophagus zeigte stammt aus dem Jahr 1982³¹. Seitdem wurde in einer Vielzahl von Studien mit verschiedenen Detektionsmethoden wie In-situ-Hybridisierung, Southern-Blot Analysen, PCR und proteinchemischen Nachweismethoden HPV in Papillomen und Karzinomen des Ösophagus nachgewiesen^{19, 32}. Von 1485 mittels In-situ-Hybridisierung untersuchten Tumoren waren 22,9 % und von 2020 mittels PCR untersuchten Tumoren 15,2 % positiv für Bestandteile des HPV Genoms³³. Zusätzlich belegen tierexperimentelle Untersuchungen, serologische Nachweise von Antikörpern gegen HPV und epidemiologische Untersuchungen in diesen Kohorten, sowie in vitro Studien, die pathogenetische Rolle von HPV beim Ösophaguskarzinom, besonders in den Endemiegebieten Chinas^{34, 35}. Allerdings konnten in nicht-endemischen Gebieten nur bei einem kleinen Bruchteil der Patienten HPV nachgewiesen werden, so dass dies einer der Gründe für die geographischen Unterschiede in der Inzidenz dieses Karzinoms sein könnte³³.

Tumore des Ösophagus sind in Mitteleuropa in der grossen Mehrzahl epitheliale Tumoren, vor allem Plattenepithelkarzinome (80-90%) und Adenokarzinome (10-20%). Erwähnenswert ist allerdings, dass die Inzidenz der Adenokarzinome in den letzten Jahrzehnten drastisch zunimmt. Dieser Trend wurde zuerst in den USA³⁶⁻⁴⁰, später dann auch in Europa, Japan, Australien und Mittelamerika beobachtet⁴¹⁻⁵³. Seit 1994 ist das Adenokarzinom in den USA der häufigste Ösophagustumor und hat das Plattenepithelkarzinom klar überholt. Hingegen wurde dieser Trend weder in Osteuropa noch in China bisher beobachtet.

Aufgrund der guten lymphatischen Drainage der Ösophagusschleimhaut metastasieren Ösophaguskarzinome rasch lymphogen. Typisch ist eine lymphogene Schleimhautmetastasierung und eine intramurale, submuköse Karzinomausdehnung, vor allem nach proximal. Fernmetastasen treten bei proximalen Tumoren vor allem in der Lunge (venöser Abfluß über Vv. thyroidea, V. azygos oder V. hemiazygos in die obere V. cava), bei distalen Tumoren vor allem in der Leber (venöser Abfluß über V. coronaria ventriculi in die Pfortader) auf. Neben der Beurteilung des histologischer Typ (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom etc.), des Differenzierungsgrads und der Infiltrationstiefe ist für die exakte

Stadieneinteilung nach UICC/TNM und AJCC (s.u.) und somit auch für die Therapieplanung die histopathologische Beurteilung des lymphogenen Metastasierungsmusters für lokale Lymphknoten (N0 vs. N1 Stadium) und entfernterer Lymphknotenstationen (M0 vs. M1) von essentieller Bedeutung⁵⁴.

Aufgrund des häufigen submukösen Wachstums und der hohen Tendenz zur Infiltration benachbarter Strukturen ist die makroskopische Beurteilung der Exzision im Gesunden durch Operateur und Pathologen und die histopathologische Beurteilung der Schnittländer durch den Pathologen von besonderer Bedeutung⁵⁴. Die makroskopisch und mikroskopisch gelungene Exzision im Gesunden (R0-Resektion) ist ein wichtiger unabhängiger positiver prognostischer Faktor⁵⁵.

1.1.3 Diagnose und Stadieneinteilung

Der Ausgangspunkt der Diagnose sind oft die Symptome Gewichtsverlust, Brustschmerzen, mit oder ohne Dysphagie. Da eine Schluckstörung in der Regel erst auftritt, wenn 2/3 des Ösophaguslumens vom Tumor verlegt sind, oder das Lumen weniger als 1 cm weit ist, stellt die Dysphagie eher ein Spätsymptom dar. Aufgrund der späten Diagnose ist die Erkrankung häufig bereits lokal fortgeschritten oder bereits metastasiert. Dies erklärt zumindest zum Teil die schlechte klinische Prognose des Ösophaguskarzinoms.

In einer Serie von 5044 Patienten, die 1994 in den USA behandelt wurden, waren als häufigste Symptome zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Schluckbeschwerden bei 74 % der Patienten, Gewichtsverlust bei 57,3 %, gastrointestinaler Reflux bei 20,5 %, Schmerzen beim Schlucken bei 16,6 % und Atemnot bei 12,1 % der Patienten als Leitsymptome erhoben worden. Bei ungefähr 50 % der Patienten war der Tumor im unteren Drittel der Speiseröhre lokalisiert. Bei 51,6 % der Patienten zeigte die Histologie ein Plattenepithelkarzinom und bei 41,9 % ein Adenokarzinom. Ein Barrett-Ösophagus war insgesamt bei 15,4 % der Patienten vorhanden, zeigte sich jedoch bei 39 % der Patienten mit Adenokarzinom. Dies ist im Einklang mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit von Patienten mit intestinaler Metaplasie der Ösophagusschleimhaut, ein Adenokarzinom zu entwickeln.

Patienten bei denen der Tumor chirurgisch entfernt wurde (also eine Positivselektion) zeigten folgende Stadien nach AJCC: Stadium I: 13,3 %, Stadium II: 34,7 %, Stadium III: 35,7 % und

Stadium IV: 12.3 %. Eine Radiochemotherapie (ohne Operation) erhielten 39,5 % der Patienten und nur 13,2 % der Patienten wurden mittels chirurgischer Entfernung des Tumors in Verbindung mit einer adjuvanten Radio- bzw. Radiochemotherapie behandelt. Das 1-Jahresüberleben für die Gesamtgruppe betrug 43%, wobei 70 % der Patienten im Stadium I aber nur 18 % der Patienten im Stadium IV 1 Jahr nach Diagnosestellung am Leben waren ³⁶. Diese Daten sind auch für Deutschland repräsentativ ⁵⁶⁻⁵⁸. Allerdings haben, wie auch im gegenwärtig in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv, die meisten Patienten trotz aggressiver multimodaler Therapie eine schlechte Prognose mit einem 5-Jahresüberleben von nur etwa 15 bis 20 %.

Die Diagnose erfolgt aktuell meist endoskopisch mittels Ösophagogastroskopie. Präoperative Staginguntersuchungen sollten Endosonographie, Röntgen des Thorax, Computertomographie des Thorax, evtl. des Abdomens bei distalen Tumoren, Abdomensonographie und histologische Sicherung des Tumorbefundes umfassen ⁵⁹. Zur Beurteilung des Ausbreitungsmusters wird zudem die Bronchoskopie bei suprabifurkalen Tumoren und die Laparoskopie bei infrabifurkalen Tumoren empfohlen. Ferner werden Untersuchung der Ösophagus- und Magen-Darm-Passage mit Breischluck empfohlen, bei zervikalem Karzinom mit wasserlöslichem Kontrastmittel aufgrund der Gefahr einer bronchialen Fistelung.

Für die endgültige Beurteilung des N-Stadiums ist die sorgfältige histopathologische Untersuchung des Tumorsektats nach Operation zwingend erforderlich. Die AJCC Richtlinien sehen die histopathologische Untersuchung von mindestens 6 mediastinalen Lymphknoten vor ⁶⁰. Aufgrund der Tatsache, dass ein grosser Teil der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im fortgeschrittenen Stadium ist, bedingt, dass nur ein geringer Prozentsatz der Patienten chirurgisch behandelt wird. Im Hinblick auf eine bessere Planbarkeit der Behandlungsmodalitäten und der Tatsache, dass ein hoher Prozentsatz der Patienten aufgrund ihrer fortgeschrittenen Erkrankung nicht operiert wird, wurde eine klinische und eine pathologische TNM Klassifikation etabliert (cTNM und pTNM) ⁶⁰.

Die Einteilung der Tumoren erfolgt einerseits anhand des Bezuges zum Tracheobronchialsystem (infrabifurkale, suprabifurkale und rein zervikale) und andererseits nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union International Contre le Cancer) und der AJCC (American Joint Commission for Classification of Cancer) (siehe **Tab. 2 und 3** ^{61, 62}).

Tab. 2: Tumor-Nodus-Metastase (TNM)-Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms der UICC und des AJCC

Primärtumor (T-Stadium)

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	kein Hinweis auf primärtumor
Tis	Karzinom in situ
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die Adventitia
T4	Tumor infiltriert benachbarte Organe

Regionale Lymphknoten (N-Stadium)

Nx	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine lokoregionären Lymphknotenmetastasen
N1	Nachweis regionalen Lymphknotenbefalls

Fernmetastasen (M-Stadium)

Mx	Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen nicht möglich
M0	kein Nachweis von Fernmetastasen
M1	Vorhandensein von Fernmetastasen
	Tumoren des unteren thorakalen Ösophagus *
M1a	Befall der zöliakalen Lymphknoten
M1b	andere Fernmetastasen
	Tumoren des mittleren thorakalen Ösophagus
M1a	nicht anwendbar
M1b	Befall nicht-regionaler Lymphknoten oder andere Fernmetastasen
	Tumoren des oberen thorakalen Ösophagus
M1a	Befall der zervikalen Lymphknoten
M1b	andere Fernmetastasen

** Aus operationstechnischen Gründen und im Hinblick auf das Muster der lymphogenen Streuung wird der thorakale Ösophagus (ca. 18 cm ab Zahnlinie) in 3 Segmente unterteilt: oberer Teil ab obere Thoraxapertur bis Trachealbifurkation, ca. 18 bis 24 cm ab Zahnlinie; mittlerer Teil von Bifurkation bis etwa 32 cm ab Zahnlinie; unterer Teil: letzte 8 cm bis ösophagogastraler Übergang inklusive des abdominalen Anteils bis ca. 40 cm ab Zahnlinie.*

Die vom AJCC etablierte klinische Stadieneinteilung beruht sowohl auf dem TNM-Stadium der UICC als auch auf der klinischen Prognose und praktischen chirurgischen Aspekten, u.a. der Resezierbarkeit.

Tab. 3: Klinische Stadieneinteilung der Ösophaguskarzinome nach AJCC ⁶⁰

Stadium	TNM Klassifikationen		
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II A	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
II B	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
III	T3	N1	M0
	T4	jedes N	M0
IV	jedes T	jedes N	M1
IV A	jedes T	jedes N	M1a
IV B	jedes T	jedes N	M1b

1.1.4 Therapie und klinische Prognose

Das Ösophaguskarzinom hat trotz Fortschritten in der Chirurgie und trotz Einsatz multimodaler Therapiekonzepte eine schlechte Prognose, die zumindest teilweise durch eine frühe regionäre lymphatische und häufige hämatogene Metastasierung bedingt ist. Retrospektive Aufarbeitungen chirurgischer und strahlentherapeutischer Studien ergaben für resektable lokalisierte Tumoren eine Fünfjahresüberlebensrate von 10-30%, für fortgeschrittene, meist nur bestrahlte Patienten sogar von nur 4 - 6%.

Die heute zu Verfügung stehenden diagnostischen Verfahren wie CT, MR und Endosonographie belegen, daß früher die Tumorausdehnung und lokoregionäre Infiltration häufig unterschätzt wurden. Ösophaguskarzinome wachsen submukös entlang der Lymphbahnen. Bei fehlender Serosa wird eine frühe Invasion in das Mediastinum und andere benachbarte Strukturen wie das Gefäß- und Bronchialsystem begünstigt.

Aufgrund der Tumorlokalisation, der Tumorausdehnung und individueller Patientenmerkmale sind selbst bei optimistischer Sicht nur etwa 50 - 60% aller Ösophaguskarzinome prognostisch sinnvoll operabel.

Für das therapeutische Vorgehen entscheidend sind die Lokalisation und das TNM Stadium der UICC, sowie die hierauf basierende AJCC Stadieneinteilung (s.o.) und insbesondere auch der Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen des Patienten. Entscheidend für die Indikation zur Operation, der Therapiemodalität der ersten Wahl, sind die Risiken des geplanten Eingriffs und die Wahrscheinlichkeit einer R0-Resektion. Nur die R0-Resektion mit radikaler Tumorentfernung und regionärer Lymphadenektomie ist als kurativer Ansatz zu bewerten. Dies ist allerdings nur bei etwa 35% aller Patienten möglich.

Die im folgenden kurz geschilderten Therapiemodalitäten basieren auf den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Richtlinien zur Strahlentherapie des Ösophaguskarzinoms wurden erarbeitet von: Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) e.V., Deutsche Gesellschaft für Medizinische Physik (DGMP) e.V., Arbeitsgemeinschaft Radiologische Onkologie (ARO) in der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) e.V., Berufsverband Deutscher Strahlentherapeuten (BVDSt) e.V. Für die internistische und chirurgische interdisziplinäre Therapie des Ösophaguskarzinoms wurde eine Interdisziplinäre Leitlinie durch die Arbeitsgemeinschaft internistische Onkologie (AIO), die Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie (CAO), die Arbeitsgemeinschaft für Radiologische Onkologie (ARO) und die Arbeitsgemeinschaft für Rehabilitation und Nachsorge (ARNS) der Deutschen Krebsgesellschaft erarbeitet⁶³. Beide Leitlinien können in der jeweiligen aktuellen Version über das Internet abgerufen werden: http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/II_onkol.htm.

Bei nicht R0-resektablen Ösophaguskarzinomen oder funktionell inoperablen Patienten wird die Strahlenbehandlung als Therapiemodalität der nächsten Wahl empfohlen. Die Strahlentherapie kann perkutan und/oder als intraluminale Brachytherapie durchgeführt werden. Im Rahmen kurativer Therapieansätze ist der kombinierte und simultane Einsatz einer zytostatischen Chemotherapie additiv zur Bestrahlung sinnvoll.

Bei operablen Patienten kommen neoadjuvante, d.h. präoperative, oder adjuvante, d.h. postoperative Radiochemotherapiekonzepte mit platinhaltigen Substanzen zum Einsatz. Trotz zahlreicher Studien bei dieser Tumorentität konnte die Prognose im Vergleich zur alleinigen

chirurgischen Behandlung durch die zusätzliche Radiochemotherapie allerdings nicht wesentlich verbessert werden (**Tab. 4**). Patienten mit kompletter Remission nach Radiochemotherapie (pT0pN0) profitieren möglicherweise bezüglich lokoregionärer Kontrolle und Überleben. Endgültige Ergebnisse dieser Studien stehen allerdings noch aus. Von Interesse ist hierbei, dass Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Patienten mit Plattenepithelkarzinom ein etwas besseres Überleben zeigen ⁶⁴, und zwar im frühen Krankheitsstadium (pT1) 83% 5-Jahresüberleben für Adenokarzinom und 63% für Plattenepithelkarzinom ⁵⁸.

Tab. 4: Stadienabhängiges Überleben von Patienten mit Ösophaguskarzinom

Überleben	Stadium I und IIA	Stadium IIB und III	Stadium IV
Median	wird nicht erreicht	12-14 Monate	9-12 Monate
2-Jahresüberleben	55% -70%	10% -25%	<10%

1.1.5 Operative Therapie

Das Risiko der operativen Therapie bei Patienten mit Oesophaguskarzinom ist wesentlich von der Erfahrung des Operateurs und der Institution abhängig. Mittlerweile konnte durch Optimierung der Operationstechniken und durch bessere supportive Massnahmen die perioperative Mortalität in den mesiten Zentren deutlich unter 10% gesenkt werden ⁵⁷. Daher sollte die operative Therapie in Zentren mit spezieller Erfahrung in der Ösophaguschirurgie erfolgen. Entscheidend für die Indikation zur Operation sind die Beurteilung des Risikos des geplanten Eingriffs und die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Tumorentfernung (R0-Resektion). Die R0-Resektion (radikale Entfernung des Tumors mit regionalem Lymphabflussgebiet) ist die wesentliche Voraussetzung für einen kurativen Behandlungserfolg ^{55, 57, 65}.

Für nichtinvasive Plattenepithelkarzinome (pTis) und bis zu 2 cm große, gut differenzierte Mukosakarzinome ist eine Mukosaresektion im Gesunden als ausreichende Therapie anzusehen, sofern durch sorgfältige endoskopische Untersuchung sichergestellt ist, dass keine

weiteren Tumorareale im Ösophagus vorhanden sind und regelmäßige endoskopische Nachuntersuchungen stattfinden (4).

Für *suprabifurkale* T1/T2-Ösophaguskarzinome ist die subtotale Oesophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler (vermutlich auch zervikaler) Lymphadenektomie (3-Feld-Dissektion) indiziert. Fortgeschrittene Tumoren (T3/T4) sind in Anbetracht ihres frühen Bezugs zum Tracheobronchialsystem häufig lokoregional nicht R0-resektabel. Sie sollten unter Studienbedingungen einer neoadjuvanten Strahlenchemotherapie mit dem Ziel zugeführt werden, ein sogenanntes „Downstaging“ zu erreichen, um hierdurch sekundär die radikale operative Therapie zu ermöglichen. Bei diesem Konzept ist allerdings mit einer Erhöhung des postoperativen Risikos in Form von Anastomoseninsuffizienz und Wundheilungsstörungen zu rechnen.

Für *infrabifurkale* T1/T2-Ösophaguskarzinome ist die subtotale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie (2-Feld-Dissektion) indiziert. Auch im fortgeschrittenen Tumorstadium kann dieses Vorgehen erfolgen, allerdings ist bei T4-Tumoren mit einem erhöhten Operationsrisiko und ungünstiger Langzeitprognose zu rechnen. Neoadjuvante Therapiemodalitäten unter Einschluss der Strahlentherapie sind derzeit in der Erprobung. Sie sind jedoch nur innerhalb kontrollierter Studien indiziert. Als Alternative kommt bei Patienten im Stadium II/III bei hohem operativem Risiko die Radiochemotherapie zur Anwendung. Sinnvolle prospektive randomisierte Studien zur ausschließlichen Radiochemotherapie fehlen bisher.

Bezüglich des therapeutischen Vorgehens beim zervikalen Ösophaguskarzinom besteht hingegen kein Konsens.

1.1.6 Präoperative (neoadjuvante) Therapie

Die alleinige präoperative Radiotherapie ist nicht zu empfehlen. Die neoadjuvante (präoperative) kombinierte Radiochemotherapie ist prinzipiell wirksam. Sie sollte bei resektablem Tumor derzeit nur innerhalb klinischer Studien eingesetzt werden. Sie wird vor allem bei lokal fortgeschrittenen suprabifurkalen und zervikalen Plattenepithelkarzinomen angewandt. Die Effizienz einer präoperativen Radiochemotherapie fortgeschrittener aber primär resektabler Tumore ohne Bezug zum Bronchialsystem (suprabifurkaler oder zervikaler

Sitz) ist bislang nur durch Phase II Studien belegt. Wirksame Substanzen sind 5-Fluorouracil, Cisplatin und Taxane. Empfohlen wird die Applikation einer Referenzdosis von 36 - 40 Gy bei Einzeldosen von 1,8 Gy täglich. Zielvolumen ist der tumorinfiltrierte Ösophagus einschließlich eines kranialen und kaudalen Sicherheitssaumes von mindestens 3 cm sowie gegebenenfalls die regionären Lymphknoten in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors. Die Lungenfunktion der Patienten muss hierbei beachtet werden.

1.1.7 Postoperative (adjuvante) Therapie

Die wenigen randomisierten Studien lassen es nicht zu, eine eindeutige Indikation bei R0-resezierten Tumoren für eine postoperative Radiotherapie abzuleiten. Die postoperative Strahlentherapie vermindert allerdings die lokoregionäre Rezidivrate ohne allerdings die Überlebensrate zu verbessern. Bei R1- oder R2-resezierten Tumoren sollte daher eine postoperative Radiotherapie erfolgen, bei ausreichendem Allgemeinzustand und Funktionsstatus des Patienten in Form einer simultanen Radiochemotherapie.

Es sollte eine Einzeldosis von 1.8 (- 2.0 Gy) täglich und, in Abhängigkeit vom R-Status (R0 , R1 oder R2) eine Gesamtreferenzdosis von 50 bis max. 56 Gy appliziert werden, bei präoperativer Radio-/Radiochemotherapie wird eine entsprechende Dosisreduktion durchgeführt um die Toxizität zu verringern.

1.1.8 Definitive Radiotherapie

Für Patienten mit einem Karnofsky-Index von 60% und mehr (WHO Grad 0-2) ist bei kurativer Therapieintention (bei Fehlen von Fernmetastasen) die primäre kombinierte und simultane Radiochemotherapie (z.B. mit 5-FU/Cisplatin oder 5-FU/Mitomycin) empfohlen. Die intraluminale Brachytherapie im Afterloadingverfahren kann eventuell als Boost appliziert werden. Die Gesamtreferenzdosis sollte (einschließlich Afterloading) 66 - 70 Gy nicht überschreiten, bei Einzelfractionen von 1,8 - 2 Gy für die perkutane Therapie und 5 -7 Gy (in 0,5 cm Gewebetiefe) pro Applikation für das intraluminale Afterloading.

1.1.9 Palliative Radiotherapie

Für Ösophaguskarzinompatienten in schlechtem Allgemeinzustand oder weit fortgeschrittenem Tumorstadium (M1) ist als Strahlentherapie primär die intraluminale Brachytherapie im Afterloadingverfahren zur Passageaufweitung und Verbesserung der Dysphagie empfohlen. Bei ein- bis zweimal wöchentlichem Afterloading werden hierbei Einzeldosen von 5 - 7 Gy kalkuliert auf 0,5 cm Gewebetiefe (entsprechend einem Quellenabstand von 7-10 mm je nach gewähltem Applikator) appliziert. Die Häufigkeit der Behandlung richtet sich nach der individuellen Symptomatik. Zur Stabilisierung der palliativen Passageaufweitung ist häufig die Implantation eines Stents oder auch Tubus sinnvoll. Bei ausgedehntem extramuralem Tumor sollte eine kleinvolumige perkutane Strahlenbehandlung durchgeführt werden.

1.2 Tumorbiologie und Molekulare Prognosefaktoren

Die Regulation von Zellproliferation und Zelltod erfolgt durch eng miteinander verknüpfte Signalwege. Im normalen und ausgereiften, adulten, sich aber dennoch ständig selbst erneuernden Gewebe besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose)⁶⁶⁻⁶⁸. Beide Phänomene werden durch komplizierte Regulationssysteme engmaschig kontrolliert^{69, 70}. Dies spiegelt sich auch in der Bedeutung dieser beiden zellbiologischen Phänomene bei der Entstehung von benignen⁷¹ und malignen Tumoren wieder⁷²⁻⁷⁶.

Die ungehemmte Aktivierung von Zellzyklus-aktivierenden Signalwegen erleichtert die Tumorentstehung, ebenso wie die Inaktivierung von Zelltodsignalwegen⁷⁷. Eine onkogene Kooperation zwischen Zellzyklus- und Apoptose-Deregulation konnte z.B. bei der malignen Transformation durch das c-myc und das Bcl-2 Gen in transgenen Mäusen gezeigt werden⁷⁸. Überexpression von Bcl-2 im B-Zellkompartiment allein löste Hyperplasie der B-Zellregionen in den Lymphgeweben aus. Die spontane oder transgene Überexpression des c-myc Gens führte hingegen zu hochmalignen B-Zell-Lymphomen. Ebenso fördert das K-Ras Onkogen nicht nur Zellwachstum sondern hemmt auch Zelltod-Signalwege⁷⁹.

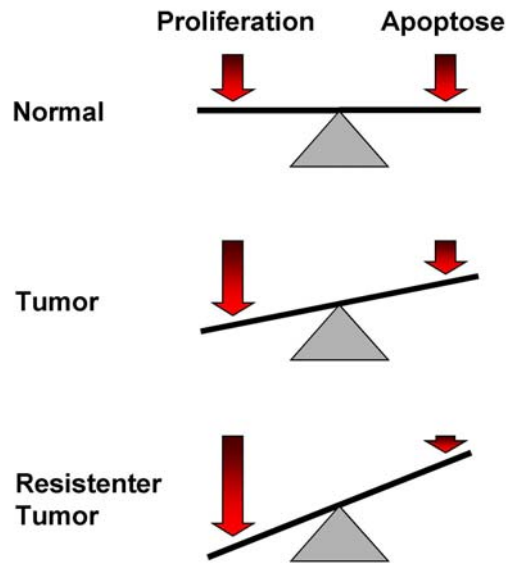


Abb. 3: Balance von Zellvermehrung und Zelluntergang

In normalem Gewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod. Unerwünschte Zellen werden durch Apoptose eliminiert. In malignen Tumoren entsteht ein Ungleichgewicht: Zellproliferation nimmt zu und Apoptose ist gehemmt. In der malignen Progression, z.B. durch Entstehung von Resistenz gegen zytotoxische Therapien oder bei Metastasierung, nimmt diese Imbalance weiter zu.

Alle malignen Tumore weisen solche Störungen der Proliferations- und der Zelltodkontrolle auf (**Abb. 3**). Maligne Tumore sind häufig genetisch instabil und akkumulieren nach den initialen transformierenden genetischen Ereignissen weitere, sekundäre genetische Veränderungen⁸⁰. Dies kann zu einem weiteren Verlust der Proliferationskontrolle und noch stärkerer Apoptose-Resistenz führen. Solche Veränderungen werden im Rahmen der Tumorprogression beobachtet, d.h. bei der Entstehung aggressiverer und Therapie-resistenter Tumore (**Abb. 3**), z.B. als Folge einer Chemo- oder Strahlentherapie.

Neuere Daten zeigen, dass die Hemmung von Zelltod zumeist nicht direkt an der eigentlichen malignen Transformation beteiligt ist, sondern nur das Überleben der betroffenen Zellen verlängert, es entsteht ein hyperplastisches Gewebe mit erhöhtem Zellgehalt. Hierdurch wird allerdings die Akkumulation genetischer Veränderungen erleichtert, die dann sekundär zum Verlust der Proliferationskontrolle führen. Beide Phänomene können also nicht isoliert betrachtet werden, und die beteiligten Signalwege sind auf einer Vielzahl von Ebenen engmaschig miteinander verknüpft.

1.2.1 Zellvermehrung

Wesentliche Erkenntnisse zur Regulation der Proliferation wurden in Hefezellen gewonnen, vor allem der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*⁸¹⁻⁸³. Defektmutanten dieser Eukaryonten führten zur Entdeckung der Cycline als Motor des Zellzyklus. Die Expression dieser Proteine oszilliert und zu bestimmten Phasen des Zellzyklus werden bestimmte Cycline hoch- oder herunterreguliert⁸⁴. Die Cycline⁸⁵ regulieren die Enzymaktivität Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK, s.u.), die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren^{86, 87}.

Zudem steuern weitere Gene die Aktivität dieser Kinasen und ermöglichen hierdurch die Kontrolle des Fortschreitens der Zelle durch die Phasen des Zellzyklus. Dies erfolgt an bestimmten Zeitpunkten, die bestimmte Schlüsselsignale erfordern, um Fortschreiten im Zellzyklus zu ermöglichen und daher als Check- oder auch Restriktionspunkte bezeichnet werden^{85, 88}. Im engeren Sinne sind Checkpunkte „Mechanismen, die eine Abhängigkeit zwischen zwei ansonsten biochemisch nicht miteinander vernetzten Regelwerken herstellen“. Die einzelnen Abschnitte des Zellzyklus setzen sich aus einer ganzen Reihe solcher in festgelegter Folge ablaufender und zeitlich aufeinander abgestimmter Prozesse zusammen, die letztlich zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen führen. Hierbei ist die exakte Verdopplung und Verteilung des Genoms in die beiden Tochterzellen zu fordern, um genetische Stabilität zu gewährleisten.

Solche Checkpunkte, die mittlerweile in jeder Zellzyklusphase bekannt sind, gestatten das Fortschreiten der Zelle im Zyklus nur dann, wenn bestimmte Signalkombinationen vorliegen. Ist dies nicht der Fall, dann werden Signalwege aktiviert, die zu Zellzyklusarrest und Reparatur oder programmiertem Zelltod, Apoptose, führen.

1.2.2 Der G1-Restriktionspunkt und Zellzyklusregulation durch den Rb-Signalweg

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus⁸⁹, der sich aus 4 definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1, S, G2 und M-Phase. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G0-Ruhephase in die G1-Phase (Gap-Phase 1) des

Zellzyklus und aus der G1-Phase in die S-Phase wird durch den G1-Restriktionspunkt in der späten G1-Phase reguliert^{90, 91}. Ist dieser Kontrollmechanismus durch physiologische Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren (s.u.) oder Deregulation von Kontrollgenen (in Tumorzellen), aufgehoben, dann geht die Zelle ungebremst in die S-Phase über und beginnt mit der DNA-Synthese. Ist die S-Phase abgeschlossen, dann gelangt die Zelle nach Durchlaufen der G2-Phase, in der die Segregation der replizierten DNA vorbereitet wird, in die M-Phase, die Mitose. Die Zellteilung wird im Anschluss beendet und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen befinden sich nun wieder in der G1-Phase.

Neben dem G1-Restriktionspunkt gibt es im Verlauf des Zellzyklus zusätzliche Checkpunkte, die den Fortschritt der Zelle durch jede der Phasen des Zellzyklus kontrollieren. Einer dieser Punkte liegt in der späten G2-Phase (G2/M-Kontrollpunkt), weitere in der S- und in der M-Phase.

Eine Dysregulation des Zellzyklus kann zwei für die maligne Transformation bedeutsame Folgen haben: Zum einen kann die Zellzahl durch eine erhöhte Proliferationsrate und/oder einen Block der physiologischen Apoptose erhöht werden (Hyperplasie), und zum anderen können Störungen an den Checkpunkten bzw. der dort ablaufenden Reparaturmechanismen zu einer erhöhten Mutagenese führen. Zellen sind während des Zellzyklus sehr empfindlich und können wesentlich leichter irreversibel und letal geschädigt werden. Diese Checkpunkte werden z.B. durch Bestrahlung oder DNA-Schädigung durch Zytostatika aktiviert, wodurch die Zelle nicht nur in der G1-Phase, sondern auch in der S-, vor allem aber auch in der G2 und den einzelnen Schritten der M-Phase arretiert werden kann, um die entstandenen Schäden zu reparieren. Die Progression der Zelle durch den Zellzyklus wird durch den Rb-Signalweg kontrolliert.

1.2.3 Zellzyklus-Hemmung durch die Retinoblastom (Rb) Genfamilie

Die Rb-Familie besteht aus den funktionell und strukturell nahe verwandten Genprodukten Rb, p107 und p130⁹²⁻⁹⁷. Die Inaktivierung beider Rb Allele, vorwiegend durch Keimbahn-Mutationen, ist mit der Entstehung von Retinoblastomen assoziiert. Neben diesen familiär, schon im frühen Kindesalter auftretenden Tumoren wird eine Inaktivierung von Rb infolge somatischer Mutationen oder Deletion des Genlokus in einer Vielzahl von Tumoren, auch beim Erwachsenen, beobachtet.

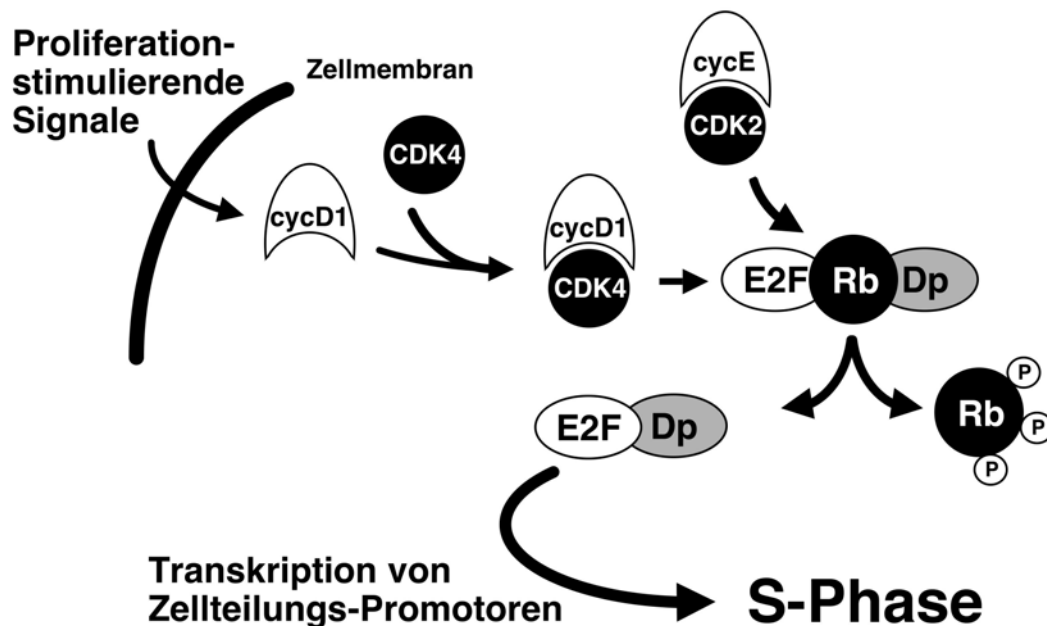


Abb. 4: Regulation der S-Phase Progression durch E2F

Nach mitogener Stimulation werden Rb-Proteine in 2 Schritten phosphoryliert. Der erste Phosphorylierungsschritt wird durch D-Cycline und die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 vermittelt. Der zweite Phosphorylierungsschritt erfolgt durch den Cyclin E/CDK2-Komplex. Das nun mehrfach phosphorylierte Rb kann Transkriptionsfaktoren wie E2F nicht mehr inhibieren und die nun freien E2F/Dp Heterodimere können Promotoraktivierung vermitteln und Gene aktivieren, die S-Phase Progression auslösen (S-Phase-Promotoren).

Die wachstumskontrollierende Funktion von Rb-Proteinen beruht auf ihrer Fähigkeit, reversibel an Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F (s.u.) zu binden⁹⁸. pRb (Rb-Protein) ist ein transkriptioneller Repressor, der durch die Interaktion mit diesen E2F-Transkriptionsfaktoren spezifisch die Promotoraktivierung Zellzyklus-regulierender Gene hemmt. Wird Rb durch die Bindung an E2F an einen Promotor gebunden, dann hemmt es ebenfalls umgebende Transkriptionsfaktoren und blockiert hierdurch die Transkriptionsmaschinerie für das betroffene Gen. Hierdurch wird die Transkription Zellzyklus-promovierender Gene gehemmt und die Zelle wird im Zellzyklus (in diesem Fall in der G1-Phase) arretiert. Die Bindungstasche in Rb (Pocket-Domäne) für diese Transkriptionsfaktoren prägte den Begriff „Pocketproteine“, der häufig synonym für die Rb-Proteinfamilie gebraucht wird⁹².

Die Bindung von pRb an E2F wird durch den Phosphorylierungsstatus von pRb reguliert (s.u.)^{94, 95}. In seiner hypophosphorylierten Form inhibiert pRb Transkriptionsfaktoren der E2F/Dp Familie und verhindert hierdurch die Hochregulation von Genen, die z.B. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. Um im Zellzyklus fortschreiten zu können, muss daher Rb phosphoryliert und hierdurch funktionell inaktiviert werden (**Abb. 4**).

Diese Rb-Phosphorylierung wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (Cyclin-dependent kinases, CDK) vermittelt. Die Aktivität dieser Kinasen wird durch spezifische Ko-Faktoren, die Cycline reguliert, deren Expression in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus rasch ansteigt und ebenso rasch gegen Ende der jeweiligen Zellzyklusphase wieder abfällt, also im Zellzyklus oszilliert.

1.2.4 Zellzyklus-Regulation durch Cycline, CDK und ihre Inhibitoren

Der Übergang von einer in die nächste Phase des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen reguliert. Diese Enzyme bilden einen Komplex mit jeweils spezifischen Ko-Faktoren, den Cyclinen. Die aktiven Cyclin/CDK-Komplexe phosphorylieren Substratproteine, z.B. die Pocketproteine der Rb-Familie (**Abb. 5**). Cyclin/CDK-Komplexe regulieren hierdurch die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus.

Werden ruhende Zellen durch Wachstumsfaktoren stimuliert, dann erfolgt die Regulation der initialen Schritte der Zellvermehrung und der Eintritt in die S-Phase durch D-Typ Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) und ihre katalytischen Partner CDK4 und CDK6. Solche proliferationsaktivierenden Signale, z.B. über die Ras-Aktivierung und die MAP-Kinase Kaskade⁹⁹ oder NF- κ B-Aktivierung, stimulieren die Expression von Cyclin D1 bzw. dessen beiden Homologen Cyclin D2 und D3. Die neu gebildeten Cycline binden an CDK4 und CDK6, wodurch deren Kinase-Aktivität angeschaltet wird. Diese Cyclin-CDK Komplexe vermitteln dann die Phosphorylierung von pRb.

Dieses Prinzip der Aktivierung einer CDK durch ein spezifisches Cyclin findet sich in allen Zellzyklusphasen. So interagiert in der frühen G1 Phase Cyclin D mit CDK4 und CDK6, gefolgt von Cyclin E/CDK2 in der späten G1 Phase, Cyclin A/CDK2 in der S-Phase, Cyclin A/Cdc2 (CDK1) in der späten S-Phase und dem S/G2 Übergang, sowie Cyclin B/Cdc2

(CDK1) in der G2-Phase und dem G2/M Übergang (**Abb. 5**). Während in epithelialen Zellen vorwiegend D1-Cyclin funktionell relevant ist, sind in hämatopoetischen Zellen besonders D2- und D3-Cyclin exprimiert¹⁰⁰.

Die D-Typ Cycline (Cyclin D1, D2, D3) kontrollieren gemeinsam mit Cyclin E¹⁰¹ den G1 Restriktionspunkt (**Abb. 4 und 5**). Rb wird durch diese D-Cycline und die assoziierten Kinasen CDK4/6 phosphoryliert, wodurch es zur Hochregulation von Cyclin E kommt, das durch Aktivierung von CDK2 einen zweiten Rb-Phosphorylierungsschritt in der späten G1-Phase auslöst^{93, 101}. CDK2 vermittelt, gemeinsam mit Cyclin E, nicht nur Progression in die S-Phase und Beginn der DNA-Replikation sondern auch Duplikation des Centrosoms, den ersten Schritt zur Verrdupplung der Chromosomen.

Die Aktivität der CDK wird durch spezifische Inhibitoren negativ reguliert. Diese Inhibitoren werden als CDKI bezeichnet (Cyclin-dependent kinase inhibitors). Bisher konnten 2 Subfamilien der CDKI identifiziert werden: die CIP/KIP Familie, die multiple verschiedene Cyclin/CDK-Komplexe hemmen kann und die INK4-Familie, die spezifisch CDK4 und CDK6 hemmt (**Abb. 5**).

Die Aktivität von CDK2 (assoziiert mit Cyclin E) kann durch CIP/KIP (CDK inhibiting protein/kinase inhibiting protein) CDKI Proteine gehemmt werden (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}). Diese CIP/KIP-Faktoren verfügen über eine konservierte, homologe Domäne, die die Bindung und Hemmung von CDK2 und CDK4 vermittelt. Diese Proteine wirken stöchiometrisch und hemmen bevorzugt CDK2-Komplexe, obwohl sie *in vitro* mit allen in der G1-Phase gebildeten CDK-Komplexen interagieren können.

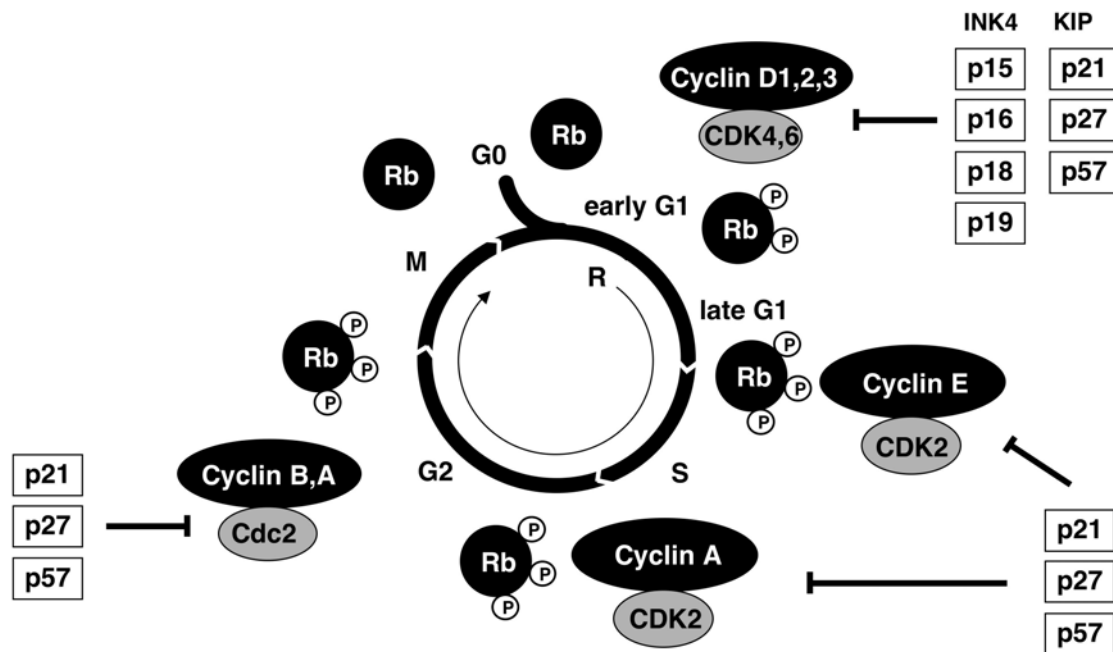


Abb. 5: Regulation der Zellzyklusphasen durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) sowie deren Inhibitoren (CDKI).

In jeder der Zellzyklusphasen sind spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen CDK (Cyclin Dependent Kinasen) interagieren und sie hierdurch aktivieren. Diese CDK phosphorylieren Rb und ermöglichen den Fortschritt der Zelle durch den Zellzyklus bis Rb gegen Ende des Zellzyklus durch Phosphatasen dephosphoryliert wird und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen nach Ende der M-Phase erneut in der G1-Phase sind. CDKI (CDK Inhibitors) können diese Cyclin/CDK Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Die CDKI der INK4a-Familie hemmen G1-Phase Cycline während die CDKI der KIP-Familie auch S- und G2-Phase Cyclin/CDK-Komplexe hemmen.

Die INK4-Familie (**I**nhibiert **C**DK**4**) besteht aus 4 nahe verwandten Faktoren: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d} 102. Die INK4 Familienmitglieder verhindern die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zyklus, indem sie die Phosphorylierung von Rb verhindern. Dies erfolgt durch Hemmung der D-Cyclin-abhängigen CDK4 und CDK6. Das somit hypophosphorylierte Rb hemmt wiederum die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F) und verhindert hierdurch die Expression von Cyclin E und weiteren für die S-Phase-Progression benötigten Faktoren. Dies erklärt auch, warum INK4 CDKI für ihre Wirkung Rb benötigen.

Die CDKs zeigen im Verlauf des Zellzyklus eine relativ lange Halbwertszeit. Im Gegensatz hierzu oszillieren die Expressionsspiegel der Cycline in den verschiedenen Phasen des

Zellzyklus, und die Phasen-spezifischen Cycline werden rasch beim Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus nach Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut, begleitet vom Anstieg des Expressionsniveaus des nächsten Cyclins. Demzufolge führt die Herunterregulation der Cyclin B Spiegel am Ende der G2- und Beginn der M-Phase zur Hypophosphorylierung von Rb und ermöglicht somit, im Zusammenspiel mit dem APC/Mad-Signalweg und De-Aktivierung des Anaphase-Checkpunkts das Ende des Zellzyklus nach Abschluss der Mitose¹⁰³.

Die Rolle von Rb in den späteren Zellzyklusphasen ist allerdings weniger gut definiert⁹⁴⁻⁹⁷. Sicher ist, dass Rb in der G2/M-Phase dephosphoryliert wird. Auch in der S-Phase wurde eine hemmende Wirkung von (dephosphoryliertem) Rb auf die DNA-Synthese beschrieben. Rb bleibt daher über die S- und G2-Phase phosphoryliert, bis es dann gegen Ende der Mitose dephosphoryliert wird, und die Zelle hierdurch erneut in der G1-Phase arretiert ist. Rb-Dehosphorylierung erfolgt unter anderem durch die PP1 Proteinphosphatase⁹⁴. Auch für die PTEN-Phosphatase wurde eine, allerdings indirekte Wirkung auf die pRb-Phosphorylierung beschrieben. Überexpression des PTEN Tumorsuppressorgens kann Proliferation von Tumorzellen hemmen und geht mit einer Dephosphorylierung von pRb einher. Dieser Effekt wird über die PI3- und Akt-Kinase vermittelt.

1.2.5 Zellzyklus und Apoptose

Signale, die den Progress von Zellen im Zellzyklus auslösen, aktivieren immer auch Zelltodsignale. Nur durch die Koordination mit Überlebens-Signalen bzw. bei Vorliegen von Zellzyklus-arretierenden Signalen kann die normale Zelle bzw. die Tumorzelle überleben⁶⁸.

Hierdurch wird verständlich, warum die Überexpression von Zellzyklus-stimulierenden Transkriptionsfaktoren wie E2F-1 und dessen Homologen¹⁰⁴ oder c-myc¹⁰⁵ oder auch von Cyclin D1¹⁰⁶ Apoptose auslöst. Werden hingegen gleichzeitig Überlebenssignale wie z.B. durch Bcl-2 oder Bcl-xL oder andere Apoptose-Hemmer vermittelt, dann überlebt die Zelle das Proliferationssignal, geht nicht in die Apoptose und schreitet im Zellzyklus fort¹⁰⁷. Möglicherweise soll durch die gleichzeitige Aktivierung von Proliferations- und Zelltodsignalen die akzidentelle Aktivierung der Zellproliferation vermieden werden. Solche fehlerhaft proliferierenden Zellen würden dann über Apoptose absterben. Dies erklärt zum Teil, warum Tumoren häufig Inaktivierungen von Zelltodsignalwegen aufweisen.

Ebenso kann die Aktivierung von Zelltodsignalen im Zellzyklus gehemmt werden, indem die Zelle in der jeweiligen Zellzyklusphase zum adäquaten Zeitpunkt arretiert wird. Zellzyklusinhibitoren wie die CDKIs, vor allem p21^{Cip/Waf}, können daher anti-apoptotische Wirkung zeigen¹⁰⁸. Allerdings kann auch die kontinuierliche Arretierung von Zellen im Zellzyklus in Phasen ausserhalb der G0/G1-Phase Zelltodsignalwege aktivieren. Hierdurch wird garantiert, dass nur solche Zellen überleben, die den Zellzyklus korrekt durchlaufen haben. Dies erklärt, warum langanhaltender Zellzyklus-Arrest an verschiedenen Checkpunkten Apoptose-Programme aktiviert. Dies gilt insbesondere für Zellen in denen gleichzeitig Proliferations-aktivierende und Zellzyklus-arretierende Signale aktiv sind, also divergierende, konkurrierende Signalwege aktiviert wurden. Dies könnte erklären, warum für alle CDKIs (vor allem p16¹⁰⁹, p21¹¹⁰ und p27¹¹¹) nach adenoviralem Gentransfer (der gleichzeitig auch die DNA-Replikationsmaschinerie der S-Phase aktiviert) eine Zelltod-fördernde Wirkung gezeigt werden konnte.

Die Aktivierung dieser Zellzyklus-assoziierten Zelltodsignale wird über Phasen-spezifische Regulatoren vermittelt. Der gegenwärtige Stand der Erkenntnis ist allerdings noch sehr fragmentarisch. Durch diese strenge Kontrolle von Zellzyklusarrest sowie von Apoptose oder Zellüberleben wird in normalen Zellen dereguliertes Wachstum verhindert. Die Koordination einer Vielzahl komplexer, nachgeschalteter Regulationswege war somit aus evolutionsgeschichtlicher Sicht die Basis für die Entwicklung komplexer vielzelliger Organismen.

Besonders gut untersucht sind die Regulation des G1-Restriktionspunkts und die Mechanismen der Vernetzung mit Apoptose-Signalwegen. Deregulation des G1-Restriktionspunkts führt über Ras-, c-myc und E2F-vermittelte Signale neben der Transkription von S-Phase Genen auch zur Induktion des p14^{ARF/INK4a} Proteins¹¹². In der Maus wird das entsprechende Homolog als p19^{ARF} bezeichnet¹¹³. ARF steht hierbei für „Alternatives Leseraster (**R**eadin**G** **F**rame)“. P14^{ARF} ist, neben dem CDKI p16^{INK4a}, das zweite Genprodukt des INK4a Genlokus und wird durch Verwendung eines eigenen Promotors und eines alternativen Exons 1 (Exon 1β) in mRNA translatiert und gespleisst. Dieses alternative Spleissen resultiert bei der Protein-Translation in einem anderen, verschobenen Leseraster des Exons 2 (**Abb. 6**). Durch dieses alternative Leseraster entsteht ein Protein mit völlig anderer Aminosäuresequenz und Funktion als p16^{INK4a}^{112, 113}.

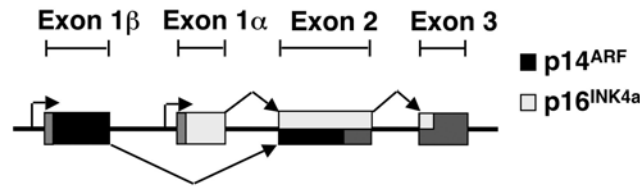


Abb. 6: Intron/Exon-Struktur des INK4a Genlokus

Alternatives Spleissen und Verwendung von Exonen resultiert in der Expression zweier verschiedener Gene vom selben Genlokus. Beide Gene werden hierbei von unabhängigen Promotoren kontrolliert, die in Tumorzellen unterschiedlich inaktiviert sein können. Der CDK Inhibitor $p16^{INK4a}$ wird vom Exon 1 alpha, Exon 2 und Exon 3 gebildet. Im Gegensatz hierzu wird das auf Aminosäure-Ebene komplett nicht-homologe $p14^{ARF}$ von Exon 1 beta, und einem Teil von Exon 2 kodiert. Exon 2 wird aufgrund des alternativen Spleissens in einem verschobenen Leseraster translatiert.

Während $p16^{INK4a}$ vorwiegend Zellzyklusarrest vermittelt induziert $p14^{ARF}$ bevorzugt Apoptose (**Abb. 7**). $p14^{ARF}$ bindet an das Mdm-2-Protein (mdm steht für **m**urine **d**ouble **m**inute, da das Gen initial in der Maus entdeckt wurde; das humane Mdm-2 wird daher auch als Hdm-2 bezeichnet). Unter normalen Bedingungen bewirkt Mdm-2 durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, dass die Proteinspiegel von p53 sehr niedrig sind: p53 ist ein transkriptioneller Aktivator des mdm-2 Gens. Das Mdm-2 Protein wiederum bindet an p53, bewirkt die Ubiquitinylierung und den Abbau von p53 über das Proteasom ¹¹⁴. Die p53 Proteinexpression und Aktivität wird somit über diesen Regulationsmechanismus vorwiegend post-translational reguliert. Die Bindung von $p14^{ARF}$ an Mdm-2 destabilisiert Mdm-2, indem es die Ubiquitinylierung und den Abbau von Mdm-2 über das Proteasom vermittelt (s.u.) ^{112, 115}. Durch die Verminderung der Mdm-2 Proteinmenge wird der negative Rückkopplungssignalweg für p53 gehemmt: p53 wird hierdurch stabilisiert und die p53 Proteinexpression erhöht (**Abb. 7**).

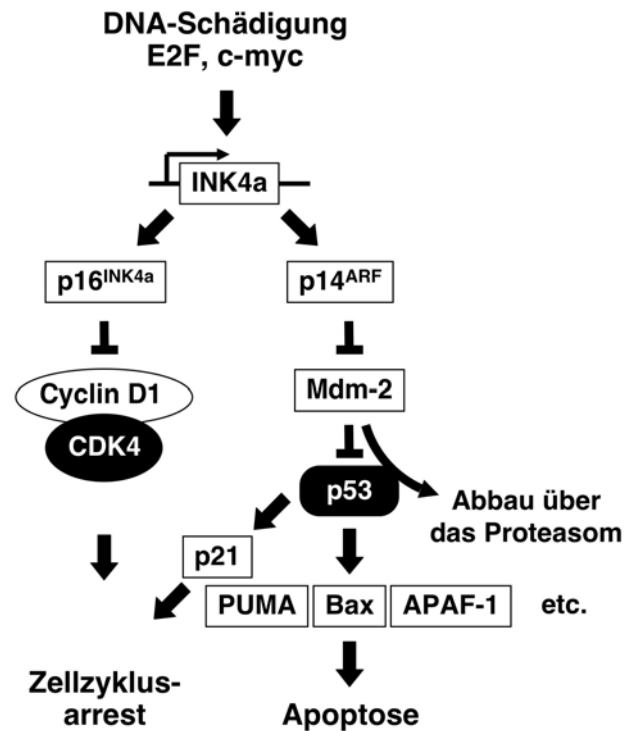


Abb. 7: Der $p14^{ARF}$ /p53 Signalweg

DNA-Schädigung oder die deregulierte Aktivierung Zellzyklus-fördernder Gene führen zur Aktivierung der Expression von $p16^{INK4a}$ und von $p14^{ARF}$. P16 vermittelt Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Hemmung von D-Typ-Cyclin/CDK4/6-Komplexen. $P14^{ARF}$ hingegen destabilisiert Mdm-2 und fördert dessen Abbau über das Proteasom. Mdm-2 ist ein Inhibitor von p53 und löst dessen Abbau über das Proteasom aus. Da $p14^{ARF}$ Mdm-2 inaktiviert, wird wiederum p53 stabilisiert, das nun nicht mehr über Mdm-2 dem Abbau über das Proteasom zugeführt wird. P53 kann nun seine Wirkung als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklus-hemmenden Genen (z.B. $p21^{Cip/WAF-1}$, 14-3-3 σ) und Apoptose-fördernden Genen (z.B. Bax, PUMA, Noxa, PIG3 (p53-induziertes Gen 3), p53AIP1 (p53 Apoptose-induzierendes Protein-1), IGF-BP3, DR5, CD95/Fas) und transkriptioneller Repressor von Überlebens-Genen (z.B. Bcl-2) entfalten.

C-myc und E2F vermitteln folglich über einen $p14^{ARF}$ /Mdm-2/p53-abhängigen Signalweg Zelltod. Allerdings wurden mittlerweile auch p53-¹¹⁶ und p21/p27-unabhängige Signalwege¹¹⁷ von $p14^{ARF}$ zur Aktivierung von Zellzyklusarrest beschrieben, so dass wahrscheinlich an der $p14^{ARF}$ -vermittelten Apoptose noch weitere, p53-unabhängige Signalwege beteiligt sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass $p14^{ARF}$ auch unabhängig von p53 und Bax den mitochondrialen Apoptosesignalweg aktivieren kann¹¹⁸.

1.2.6 Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose durch p53

Das p53 Gen zählt zu den am häufigsten inaktivierten Genen in malignen Tumoren. Das p53 Protein ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und der Apoptose und wird z.B. nach DNA-Schädigung, zum Beispiel durch ionisierende γ -Strahlung, aktiviert und kontrolliert eine Vielzahl von Zellantworten. Eine besonders wichtige Funktion besteht in der Hemmung des Zellwachstums und in der Aktivierung von Mechanismen, die zur Apoptose führen. Über diese Mechanismen kann p53 Tumorwachstum verhindern und wird daher als Tumorsuppressor bezeichnet. Durch Mutationen oder Deletion der chromosomalen Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p) kann p53 inaktiviert werden.

Eine Reihe von Arbeiten zeigte, dass eine solche p53-Inaktivierung mit einer schlechteren Prognose der zugrundeliegenden Tumorerkrankung einhergehen kann¹¹⁹. P53 wird nicht nur transkriptionell sondern vorwiegend posttranslational reguliert¹²⁰. Die basale Proteinexpression ist gering, wird jedoch durch genotoxische Schäden (Bestrahlung, Chemotherapie) oder andere zelluläre Stressfaktoren wie Hypoxie, Hitze, virale Infektion oder Onkogen-Aktivierung (z.B. E2F und c-myc) erhöht, da diese Vorgänge, z.B. über p14^{ARF}, das p53-Protein stabilisieren, indem sie seinen Abbau über das Proteasom hemmen und seine Halbwertszeit verlängern (**Abb. 7**). P53 kann sowohl als Transkriptionsfaktor für Gene wie APAF-1, p21^{Cip/WAF}, Bax, PUMA, NOXA, p53-AIP1, 14-3-3, Gadd45, IGF-BP3, PIG-Gene etc.¹²¹⁻¹²⁴ dienen, als auch als transkriptioneller Repressor die Expression anderer Gene direkt oder indirekt reprimieren (z.B. Bcl-2, Cdc2 und Cyclin B)¹²⁰. Bezüglich der p53-vermittelten Effektormechanismen wie Zellzyklus-Arrest oder Aktivierung von Apoptose-Signalwegen existieren deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen, wodurch ein Teil der diversen Daten in der Literatur erklärt werden kann. Die Inaktivierung von p53-Homologen wie p73 und anderen ist weniger gut untersucht. Mittlerweile liegen jedoch eine Reihe von Daten vor, die zeigen, dass diese Homologen über die selben Effektormechanismen wirken wie p53 und, ebenso wie p53, durch Deletion der entsprechenden Genregion in malignen Tumoren inaktiviert werden können¹²⁵⁻¹²⁷. Mutationen der p53-homologen Gene scheinen jedoch selten zu sein. Kürzlich wurden allerdings neben der Mutation von p53 auch Mutationen im p53 Homolog p63¹²⁸ in der Blastenkrise der chronischen myeloischen Leukämie (CML) beschrieben. Das Homolog p73 hingegen ist in Tumoren extrem selten mutiert, wird aber in der Blastenphase der CML in aberranten Spleissvarianten exprimiert, deren funktionelle Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist¹²⁹. Das Fehlen der N-terminalen Domäne (Δ N-p73) resultiert in Proteinvarianten mit dominant-negativer Funktion,

die DNA-Bindung und Tetramerisierung funktionaler p73 und p53 Komplexe blockieren können^{130, 131}.

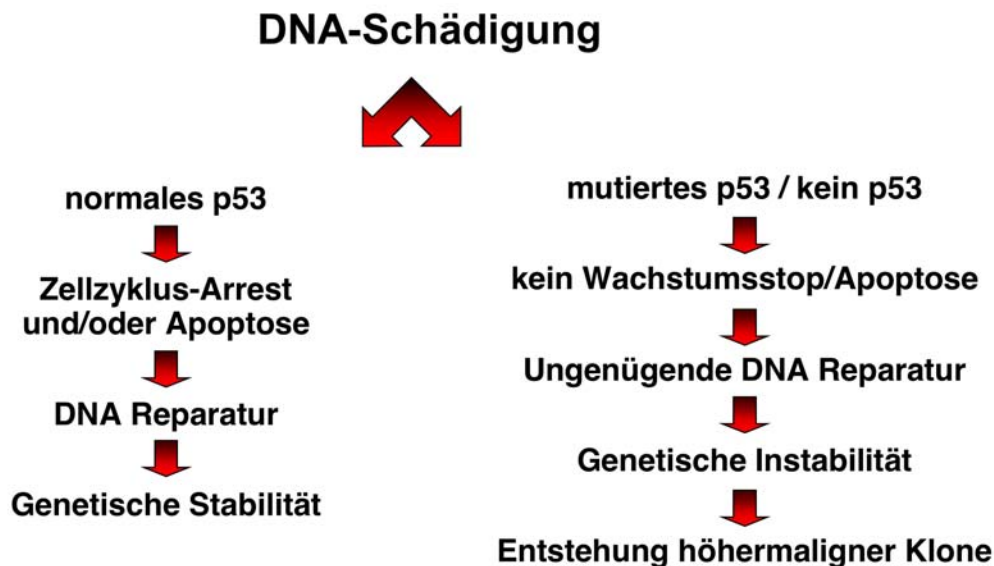


Abb. 8: Zelluläre Antwort auf genotoxische Schäden

Schematische Darstellung der Signaltransduktionsebenen, die zelluläre Antwort auf Schädigung der DNA und der DNA-Replikation vermitteln, z.B. nach Replikationsfehlern, Bestrahlung oder chemischer Schädigung.

Der p53-vermittelte Zellzyklusarrest und die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen nach Bestrahlung oder chemischer Mutagenese ermöglicht der Zelle sich von der genotoxischen Schädigung zu erholen und zu überleben^{88, 132}. Versagen die Reparaturmechanismen, dann überwiegen die ebenfalls von p53 aktivierten Zelltodsignale und die Zelle stirbt (**Abb. 8**). Experimentelle Daten hierzu kamen erstmals von der Gruppe von Vogelstein, die zeigten, dass der knock-out von p21^{Cip/Waf} (oder auch von p53, eines der transkriptionellen Aktivatoren von p21) die Fähigkeit von Tumorzellen inaktiviert, nach DNA-Schädigung im Zellzyklus beim G1 und G2/M Restriktionspunkten zu arretieren¹⁰⁸. Tumorzellen, die durch gezielten Gen-knock-out von p53¹³³ bzw. p21¹⁰⁸ oder 14-3-3σ¹³⁴ einen G2-Checkpoint-Defekt aufwiesen, wurden nach DNA-Schädigung durch Chemotherapie polyploid und starben daraufhin über Apoptose. P53 kann daher in einer

solchen Situation also auch als Zelltod-hemmendes Gen wirken, in dem es über seine Zellzyklus-arretierende Wirkung Apoptose-Mechanismen hemmt und Reparatur ermöglicht.

Dennoch haben p53-mutierte Tumorzellen auf Grund ihres Apoptose-Defekts einen Selektionsvorteil (**Abb. 8**). Ein Teil der malignen Zellen überlebt aufgrund des Apoptosedefekts die zytotoxische Behandlung und wird durch die Therapie selektiert ¹³⁵. Klinisch resultiert dies in einem Therapie-unempfindlicheren Rezidivtumor. Prinzipiell gilt ein solcher Selektionsvorteil auch für Tumorzellen, die andere Defekte in Zelltodsignalwegen erworben haben, z.B. Inaktivierung von p14^{ARF} ¹³⁶ oder auch Bax ^{137, 138}.

1.2.7 Inaktivierung von Zellzyklusregulatoren in Tumoren

Maligne Tumore sind durch Deregulation der Zellproliferation gekennzeichnet. Es ist daher auch nicht überraschend, dass über verschiedenste Veränderungen, die in vielen Fällen noch völlig ungeklärt sind, Zellzyklus-aktivierende Gene dereguliert werden, die den Eintritt aus der G1- in die S-Phase ermöglichen. Neben den Cyclinen D1, D2 und D3 sind dies vor allem E2F-Homologe und das c-myc-Gen.

C-myc nimmt hierbei eine besondere Stellung ein, da es bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen und in soliden Tumoren durch Genamplifikation oder auch durch chromosomale Translokation dereguliert werden kann. In der Mehrzahl der Burkitt-Lymphome erfolgt dies durch t(8;14) Translokation oder andere Translokationen, die das c-myc-Gen unter die Kontrolle von Immunglobulin-Enhancer-Sequenzen bringen, die dann die konstitutive Expression des c-myc Gens vermitteln. Beschrieben wurden auch Punktmutationen, die die Bindung und Inaktivierung durch pRb blockieren. Ein weiterer Mechanismus der myc-Deregulation ist die Genamplifikation, die bei ca. 10% der hochmalignen B-Zell-Lymphome nachgewiesen werden kann ¹³⁹ und bei 23 bis 31 % der Ösophaguskarzinome ^{140, 141}.

Störungen von hemmenden Zellzyklus-Regulatoren können in nahezu jedem Tumor nachgewiesen werden: Eine Vielzahl maligner Tumore zeigt eine gestörte CDKI Aktivität. Als mögliche Ursachen der Inaktivierung kommen in Frage: (1) verminderte Expression durch Promotormethylierung, (2) Deletion der entsprechenden Region (3) Mutation des CDKIs, (4) Mutation der entsprechenden CDK und (5) Störung eines Regulators der CDKI Expression.

Die Bedeutung einer Deregulation der CDKIs für die Tumorbilogie ist noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass ein Verlust dieser Zellzyklusinhibitoren die Deregulation des Zellzyklus verstärkt. Unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um ein primäres Ereignis handelt, das ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt ist oder ein sekundäres genetisches Ereignis im Rahmen der Tumورprogression.

Der Verlust solcher CDKIs ist häufig mit einer schlechten Prognose der Erkrankung verbunden. Besonders gut untersucht wurde dies im Fall von p16^{138, 142}. Solide Tumoren zeigen häufig eine p16-Überexpression. Der Verlust dieser hohen p16 Expression ist bei einer Vielzahl von Tumoren mit einer schlechteren Prognose verbunden, unter anderem auch beim Ösophaguskarzinom^{138, 143}. Weiterhin spielt p16-Inaktivierung auch eine pathogenetische Rolle bei der malignen Transformation des Barrett-Ösophagus^{144, 145}. . Ebenso konnte für Mantelzonen-Lymphome gezeigt werden, dass ein Verlust der entsprechenden chromosomalen Region (9p) mit einem höheren Proliferationsindex, einer deutlich schlechteren Krankheitsprognose bzw. der Transformation zu hochmalignen Lymphomen assoziiert ist¹⁴³. Neben p16 wird beim Ösophaguskarzinom und anderen Tumoren auch p21 bzw. p27-Verlust beobachtet, ebenso wie Überexpression der CDKI Gegenspieler, Cyclin E und A. Von Interesse ist hierbei, dass normale p27 Expression und Funktion durch hohe Cyclin E Spiegel überwunden werden kann (wie auch andere CDKI). Dies kann, neben gesteigerter transkriptioneller Aktivierung der Genexpression, auch durch Hemmung des Abbaus erfolgen. Mutationen des F-Box-Proteins Cdc4 führen zu erhöhten Cyclin E-Spiegeln, die Wildtyp p27 überwinden können¹⁴⁶.

Hieraus wird auch klar, dass unterschiedliche Ereignisse den G1-Restriktionspunkt deregulieren können. Die Defekte können auf jeder Ebene des Signalwegs auftreten. Das Resultat ist das gleiche: Deregulation von S-Phase-Progression. Häufig sind diese Defekte alternativ, d.h. es ist entweder p16 oder Cyclin D1 oder Rb betroffen. Allerdings können Tumorzellen auch mehrere Defekte akkumulieren. Unklar ist jedoch noch, ob solche kombinierten Defekte nur redundant sind oder synergistisch wirken und mit einer höheren Malignität und noch rascherem Wachstum korrelieren.

1.2.8 Zelltodsignalwege

Programmierter Zelltod, Apoptose, wird durch distinkte Signale und Signalwege reguliert (**Abb. 9**). Ein diesen Signalwegen gemeinsames Prinzip ist die Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes (DISC; Death-inducing signaling complex), an die sich kaskadenartig verstärkende Aktivierung einander nachgeschalteter Apoptose-fördernder Faktoren anschliesst, welche die Aktivierung exekutierender Enzyme, der Caspasen vermitteln ¹⁴⁷. Dies ist ein evolutionär konserviertes Prinzip, das zu solch archaischen Organismen wie dem Wurm *Cenorhabditis elegans* und wahrscheinlich noch älteren Organismen wie den fakultativ mehrzelligen Schleimpilzen (*Dictyostelium*) und sogar Bakterien zurückverfolgt werden kann ^{67, 70}.

Die bisher am besten molekular definierten DISC-Signalwege werden durch Mitochondrien ¹⁴⁸ und die Death-Rezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie vermittelt ^{147, 149}. Es gibt zudem Hinweise, dass auch andere Zellkompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER) über die Aktivierung der Caspase-12 Apoptose induzieren können, z.B. bei Stressreaktionen des ER im Rahmen deregulierter Entleerung des Calcium-Speichers oder massiver Akkumulation pathologischer Proteine (Unfolded Protein Response, UPR) bei Virus-Infektionen oder Amyloid-Protein beim M. Alzheimer.

Die Ausbildung und Aktivierung eines DISC resultiert in der raschen Rekrutierung von Inducer-Caspasen (wie der Caspase-2, -8, -9, -10, oder -12). Diese Inducer-Caspasen aktivieren in der Signalkaskade nachgeschaltete Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6- und -7), die dann die Apoptose exekutieren und hunderte von regulatorischen Proteinen degradieren, sowie andere Protease-Systeme und Endonucleasen aktivieren ¹⁵⁰. Vergleichbar den Enzymkaskaden der Blutgerinnung oder des Komplementsystems wird durch die Aktivierung der Caspase-Signalkaskade eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht. Hierdurch wird die irreversible Zerstörung der Zelle eingeleitet.

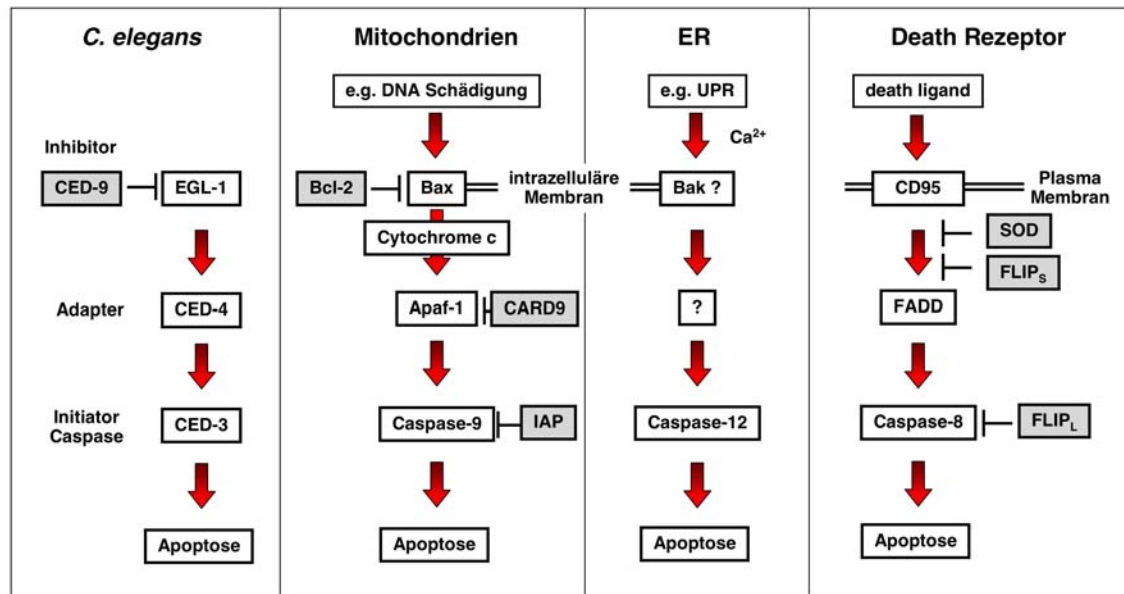


Abb. 9: Apoptose-Signalwege

Das grundlegende Konzept der Aktivierung und Hemmung der Apoptose-Signalkaskade kann evolutionsgeschichtlich bis zu archaischen Organismen wie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zurückverfolgt werden. Der humane Apoptosehemmer Bcl-2 ist ein Homolog des *C. elegans* ced-9 Gens (*cell death Gen-9*), das Apoptose-fördernde Bax ist ein Homolog von egl-1, APAF-1 enthält eine Domäne mit Homologie zu ced-4 und Caspase-3 ist ein Homolog von ced-3. Die Aktivierung eines Zelltod-Effektors wie Bax führt zur Bildung eines Apoptose-induzierenden Signalkomplexes (Death-inducing signaling complex, DISC) und zur Aktivierung von Initiator-Caspasen. Bak lokalisiert besonders ausgeprägt auch im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und kann dort die Apoptose-Induktion nach ER-Stress vermitteln (z.B. bei Unfolded Protein Response, UPR). Analog hierzu wird bei Aktivierung von Death-Rezeptoren durch die entsprechenden Liganden ein zytoplasmatischer DISC aus z.B. dem Adapterprotein FADD und der Procaspase-8 gebildet. Die Initiator-Caspasen aktivieren Downstream-Caspasen, die den apoptotischen Zelltod exekutieren. Inhibitoren können diese Signalwege auf jeder Ebene inhibieren; auf der Ebene der Aktivatoren (z.B. Bcl-2), der Adapter (z.B. Bcl-2, FLIP, SOD, CARD-9), bzw. auf der Ebene der Caspasen: FLIP_L und IAPs.

CED: *C. elegans* death gene, ER: endoplasmatic reticulum, UPR: unfolded protein response, SOD: silencer of death domain. FLIP_S: short splice variant of Fas-linked inhibitory protein, FLIP_L: long splice variant, FADD: Fas-associated death domain, IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins, CARD: Caspase-Rekrutierungs-Domäne.

Die Bildung eines DISC wurde erstmals für Death-Rezeptor-vermittelte Apoptose für den CD95/Fas-Rezeptor beschrieben¹⁵¹. Durch Rezeptor-Oligomerisierung ausgelöst durch Bindung des Liganden oder durch agonistische Antikörper erfolgt die Rekrutierung von FADD (Fas associated death domain) Adapterproteinen über Bindung des Adapterproteins an die zytosolisch lokalisierte Todesdomäne (death domain) des Rezeptors. FADD kann

wiederum über seine DED (death effector domain) die Procaspasen-8 bzw. -10 rekrutieren. SOD-Proteine (silencer of death domain) können hingegen die Rekrutierung von FADD hemmen¹⁵². Ebenso können FLIP-Proteine die Bindung der Procaspase-8 (kurze und lange Spleissvariante, FLIP_S, FLIP_L) bzw. die Aktivierung der Procaspase-8 hemmen (FLIP_L)¹⁵³.

Ein vergleichbarer Komplex (nicht homologer) Signalproteine wurde später für den mitochondrialen Apoptose-Signalweg definiert. Hier wird der DISC von dem zytosolischen Adapterprotein APAF-1 gebildet, das mitochondriale Ko-Faktoren (Cytochrom c und (d)ATP) bindet und hierdurch aktiviert wird¹⁵⁴. Aktiviertes APAF-1 rekrutiert über die nun zugängliche CARD-Domäne die Pro-Caspase-9, die sowohl im Zytosol lokalisiert ist, als auch aus Mitochondrien freigesetzt wird. Dieser Proteinkomplex aus APAF-1, Cytochrom c und Pro-Caspase-9, sowie ATP, stellt den mitochondrialen DISC dar, der auch als mitochondriales Apoptosom bezeichnet wird.

1.2.9 Mitochondrien und Apoptose

Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs (**Abb. 10**) wird von Bcl-2 (B cell lymphoma gene 2), Bcl-x_L (lange Spleissvariante des Bcl-x Proteins) und andere Apoptose-hemmende Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie kontrolliert und gehemmt¹⁵⁵. Im Gegensatz hierzu vermögen Apoptose-fördernde Mitglieder dieser Genfamilie, wie z.B. Bax (Bcl-associated X protein)¹⁵⁶, Bak¹⁵⁷ und Bok¹⁵⁸, direkt Mitochondrien zu aktivieren. Der Verlust der Bax Expression ist in den meisten Tumoren mit der Resistenz gegen zytotoxische Therapiemodalitäten verbunden^{137, 159, 160}. Der Apoptose-regulierende Mechanismus der Bcl-2 Familienmitglieder ist, obwohl Bcl-2 als eines der ersten Gene in dieser Signalkaskade identifiziert wurde, immer noch nicht vollständig klar. Als gesichert gilt, dass Bax und dessen Homologe Bak und Bok direkt Mitochondrien aktivieren können, die daraufhin Cytochrom c und ATP aus dem Raum zwischen innerer und äusserer Mitochondrienmembran freisetzen¹⁶¹. Dieser Vorgang kann durch Bcl-2 gehemmt werden¹⁶².

Die Aktivierung der Mitochondrien kann hierbei in distinkte Aktivierungsschritte unterteilt werden: (1) Die Konformationsänderung im N-Terminus von Bax löst die Translokation vom Zytoplasma und Insertion in die äussere Mitochondrienmembran aus. (2) Dies führt als ein sehr frühes Ereignis zur Öffnung von Kanälen und Freisetzung von ATP und Cytochrom c. (3) Die Atmungskette als Energielieferant bleibt aktiv. (4) Erst später kommt es durch den

Einstrom zytosolischer Ionen und H₂O zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials (Verlust von $\Delta\Psi_m$), der mitochondrialen Permeabilitäts-Transition, mit Anschwellen der Mitochondrien und Platzen der äusseren und später auch der inneren Membran und letztlich (5) dem Zusammenbrechen der Atmungskette^{148, 163}. Es ist nach wie vor nicht völlig geklärt, wie diese Kanäle gebildet werden. Sowohl für Bcl-2 als auch Bax konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nicht nur über die BH-Domänen (**B**cl-2 **H**omologie) dimerisieren, sondern auch oligomerisieren können, um selbst Kanäle zu bilden¹⁶⁴. Neben dieser Kanalbildung regulieren Bcl-2 und Bax aber auch spannungsabhängige mitochondriale Kanäle¹⁶⁵, die in der äusseren Membran durch das VDAC-Protein (Voltage Dependent Anion Channel)¹⁶⁶ und in der inneren Membran durch das ANT-Protein (Adenin-Nukleotid Transporter) gebildet werden¹⁶⁷. Die Aktivität dieser Kanäle kann durch den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor, der auch in der äusseren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, moduliert werden.

Das nun zytosolische Cytochrom c bindet an APAF-1, und zwar an dessen WD40-Domäne¹⁶⁸. Gemeinsam mit der Bindung von ATP bzw. dATP an die CED4-Homologiedomäne von APAF-1 wird hierdurch eine Konformationsänderung in APAF-1 ausgelöst, wodurch die CARD-Domäne (**C**aspase-**R**ekrutierungs-**D**omäne) exponiert wird. Dies ermöglicht die Bindung der Procaspase-9 an die APAF-1 CARD-Domäne. Die WD40-Domäne vermittelt auch die Dimerisierung von APAF-1¹⁶⁹, wodurch mindestens 2 Procaspase-9 Proteine in engen räumlichen Kontakt gelangen und sich autokatalytisch zum biologisch aktiven Caspase-9 Heterotetramer spalten¹⁷⁰. Neuere Daten lassen vermuten, dass dieses mitochondriale Apoptosom durch weitere CARD-enhaltende Proteine zu grossen multimeren Proteinkomplexen assoziiert. Dies erleichtert die Aktivierung der Initiator-Caspase. Die aktive Caspase-9 kann durch limitierte Proteolyse die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktivieren und hierdurch die Exekution der Apoptose einleiten¹⁵⁰.

Neben Cytochrom c werden noch weitere Proteine aus den apoptotischen Mitochondrien freigesetzt, unter anderem (1) AIF (Apoptosis Inducing Factor), der hohe Homologie zu bakteriellen Flavoproteinen aufweist, in den Zellkern transloziert und dort eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentierung in hochmolekulare Fragmente auslöst¹⁷¹. Die Morphologie des AIF-induzierten Zelltods ähnelt mehr der Nekrose. Der Beitrag dieses Faktors zum apoptotischen Zelltod ist allerdings nach wie vor nicht völlig geklärt. (2) SMAC (second mitochondrial activator of caspases)¹⁷², das die Aktivität der anti-apoptotischen IAPs

(s.u.) hemmt und hierdurch die Exekution der Apoptose verstärkt und (3) Hsp10, das anti-apoptotische Funktion hat und die Aktivierung der Procaspase-9 hemmen kann ¹⁷³.

Die Apoptose-hemmende Wirkung von Bcl-2 ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Bis vor kurzem wurde die hemmende Wirkung von Bcl-2 im Apoptosom lokalisiert. Grundlage hierfür war, dass eine direkte Bindung von Bcl-x_L über dessen Bcl-2-Homologie-Domäne Nr. 4 (BH4) an Ced-4, das *C. elegans* Homolog von APAF-1 demonstriert wurde ¹⁶⁹. Diese Interaktion ist jedoch physikalisch sehr schwach und mittlerweile konnte durch zellbiologische Untersuchungen gezeigt werden, dass Bcl-2 die Apoptose-fördernde Wirkung von APAF-1 nicht zu blockieren vermag. Als wahrscheinlichstes Modell wird daher zur Zeit favorisiert, dass Bcl-2, Bcl-x_L und deren funktionelle Apoptose-hemmenden Homologen die Wirkung der Apoptose-Promotoren Bax, Bak und Bok inhibieren. Dieser Effekt wird über die physische Interaktion über die Bcl-2 Homologie-Domänen BH1, BH2, vor allem aber auch über die BH3 Domäne vermittelt. APAF-1 hingegen wirkt nachgeschaltet und übt seine Caspase-aktivierende Funktion erst nach Freisetzung des Cytochrom c aus.

Die Unterfamilie der BH3-only Proteine der Bcl-2 Genfamilie, die nur eine BH3, aber keine BH1, BH2, oder BH4 Domäne enthalten, reguliert den Vorgang der Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs, indem sie Apoptose-hemmende Proteine wie Bcl-x_L und Bcl-2 aus der Bindung an Bax verdrängen können und hierdurch Bax (oder auch Bak) aktivieren. Solche Wirkungen wurden mittlerweile für Bad, Bim und Bid gezeigt. Diese BH3-only Proteine agieren wahrscheinlich als Bindeglieder zwischen spezifischen Signalkaskaden und der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade.

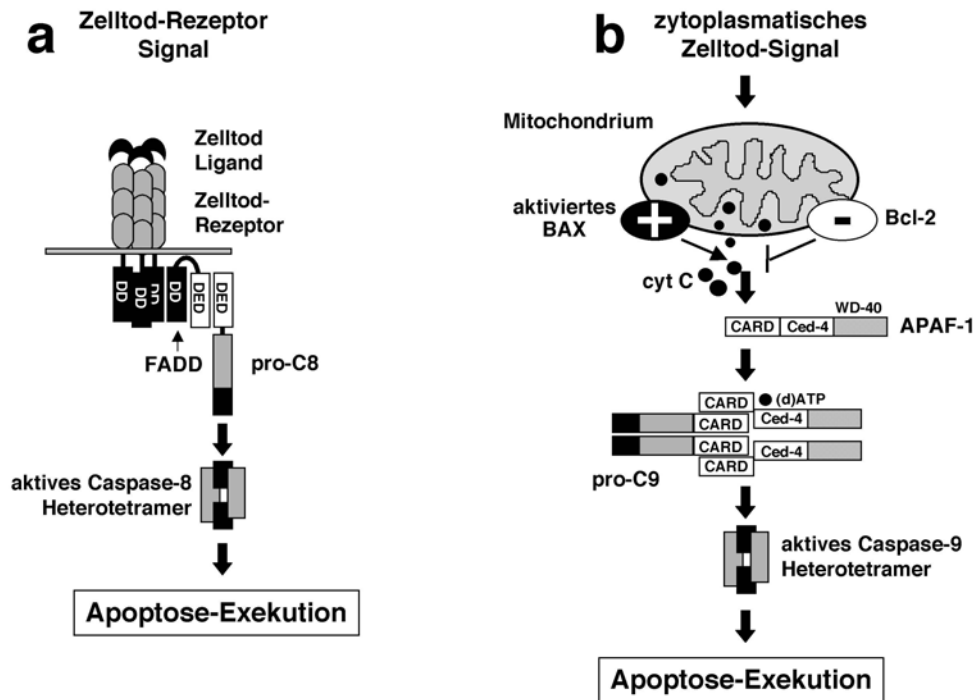


Abb. 10: Aktivierung des mitochondrialen und des Death-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegs.

A. Aktivierung von Death-Rezeptoren führt zur Bildung eines DISC. Im Fall des CD95/Fas Rezeptors führt die Bindung des trimeren Fas Liganden an ein Rezeptor-Trimer zur DISC-Bildung: das FADD Adapterprotein wird über die Death-Domänen in CD95 und FADD rekrutiert. Dies stimuliert die Bindung von Pro-Caspase-8 (C8) über die Death-Effektor Domäne (DED) in pro-C8, wodurch die Aktivierung von pro-C8 zur aktiven C8 induziert wird.

B. Der mitochondriale Apoptose-Signalweg kann über die Aktivierung von p53, z.B. nach DNA-Schädigung, aktiviert werden. Über Bax wird die Freisetzung von Cytochrom c induziert. Dies führt zur Aktivierung des APAF-1 Adapterproteins, wodurch die Rekrutierung von pro-C9 in den Komplex ausgelöst wird. Pro-C9 wird autokatalytisch aktiviert und die Effektor-Caspase-Signalkaskade aktiviert.

DD: Death Domäne, DED: Death Effektor-Domäne, DISC: Death-Inducing Signaling Complex, FADD: Fas-assoziierte Death Domäne.

2. Fragestellung

Das Ösophaguskarzinom ist ein sehr aggressiver Tumor und hat trotz Fortschritten in operativen Techniken, der Strahlen- und der Chemotherapie, nach wie vor eine schlechte Prognose. Leider haben die bisherigen aggressiven multimodalen Therapiekonzepte die Prognose jedoch nicht wesentlich verbessern können. Ziel dieser Arbeit ist daher, über Bestimmung von molekularen Markern, die Aggressivität der Tumoren individuell zu bestimmen, um zukünftig die Therapie für jeden Patienten durch Eskalation bzw. De-Eskalation optimieren und damit das Überleben signifikant verbessern bzw. unnötige Therapien vermeiden zu können. Diese Untersuchungen sollten an einem Kollektiv von 53 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus retrospektiv durchgeführt werden, die mit kurativer Intention R0-reseziert wurden. Im Hinblick auf die hohe Relevanz von Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose für die Tumorphagenese und die Tumorbilogie sollten Komponenten des Rb-Signalwegs (Rb, Cyclin D1, Cyclin E, p16^{INK4a}, p27^{KIP1}, sowie K-ras als übergeordnetes Onkogen) und des p53-Signalwegs (p53, Bax, Bcl-2, p21^{CIP/WAF-1}) bezüglich Expression bzw. Mutation untersucht und mit klinisch-pathologischen Charakteristika korreliert werden. Hierdurch sollte ein Bezug hergestellt werden zwischen der Inaktivierung von Zellzyklus-Kontrollmechanismen und der Störung von Zelltodsignalwegen. Neben den hierdurch gewonnenen Erkenntnissen zur Tumorbilogie sollte die prognostische Relevanz der genannten Gene geprüft werden. Als wesentlichster Aspekt dieser Arbeit sollten Risikoprofile in Form einer Multigen-Analyse erstellt werden, um Risikogruppen des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus mit schlechtem Therapieansprechen und kurzem Überleben bzw. Patienten mit besonders guter Prognose zu identifizieren.

3. Patienten und Methoden

3.1 Patienten

Durchgeführt wurde eine retrospektive Untersuchung von 53 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Der Tumor wurde mit kurativer Intention vollständig im Gesunden reseziert ohne histopathologischen Nachweis von Tumorresten am Schnitttrand, d.h. es erfolgte eine R0-Resektion. Alle Patienten wurden an der Universitätsklinik Frankfurt in der Abteilung Abdominal- und Gefäßchirurgie operiert.

Tab. 5: *Klinisch-pathologische Charakteristika der Patienten und ihrer Tumore (n=53)**

Geschlecht	Männer/Frauen (Anzahl der Patienten)	40/13
Alter (Jahre)	Median Range	54.9 39.6-70.2
T-Stadium	T1 T2 T3 T4	5 (9.4%) 15 (28.3%) 29 (54.7%) 4 (7.5%)
Lymphknotenbefall	Nodal negativ Nodal positiv	27 (50.9%) 26 (49.1%)
Grading	G1 G2 G3 G4	5 (9.4%) 38 (71.7%) 9 (17%) 1 (1.9%)
Stadium	I IIa IIb III IV	3 (5.7%) 22 (41.5%) 8 (15.1%) 20 (37.7%) 0
Ösophagektomie	Transösophageal transhiatal	33 (62.3%) 20 (37.7%)
Zusätzliche Therapie**	Ja Nein	15 (28.3%) 38 (71.7%)

* Falls nicht anderweitig bezeichnet ist die Anzahl und in Klammer der jeweilige Prozentwert gezeigt.

** Radio- or Radiochemotherapie

Das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen betrug 40 zu 13. Das mediane Alter bei Erstdiagnose betrug 54,9 Jahre (Range 39,6-70,2). Die Operationen erfolgten zwischen 1985 und 1995. Keiner der Patienten hatte bei Erstdiagnose Fernmetastasen. Insgesamt wurden im Zeitraum von 1985 bis 1995 63 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom den Ösophagus behandelt und R0-reseziert. In Paraffin eingebettetes Tumormaterial konnte von 53 Patienten gesammelt werden. Bei den übrigen 10 Patienten, von denen kein Tumormaterial verfügbar war, handelte es sich um 9 Männer und eine Frau, medianes Alter 46 Jahre (Range 42-75), die zwischen 1987 und 1991 operiert wurden.

Stadium und weitere charakteristische Punkte sind in der **Tabelle 5** aufgeführt. Bei den meisten Patienten wurde eine transthorakale Ösophagektomie durchgeführt (33/53), alternativ wurde bei 20 Patienten eine transhiatale Ösophagektomie durchgeführt. Bei 49 Patienten wurde ein Magenkonduit eingesetzt, um die gastrointestinale Kontinuität zu gewährleisten. Die verbleibenden 4 Patienten erhielten ein Konduit mit Kolon bzw. Dünndarm. Insgesamt wurden 15 Patienten adjuvant, d.h. postoperativ, mit einer alleinigen Strahlentherapie oder einer kombinierten Radiochemotherapie behandelt.

3.2 Immunhistochemie

Proteinexpression wurde mit Hilfe der Immunhistochemie nachgewiesen. Hierzu wurden 4 µm dünne Schnitte von formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Tumormaterial angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen. Hierzu wurden die Paraffinblöcke auf – 10°C gekühlt. Zur Entparaffinierung wurden die Präparate in Färbekörbe eingesetzt, mindestens 20 Minuten in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkohol-Konzentrationsreihe (96%, 80%, 70%, 50% für jeweils 3-4 Minuten) gewaschen, um das Xylol und das darin gelöste Paraffin zu entfernen. Danach wurde in Aqua bidest. rehydriert und nachfolgend in TBS (Tris-buffered saline)-Puffer der pH-Wert äquilibriert. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Proben im Schnellkochtopf mit Citratpuffer (bei pH 6,0) für ca. 5 Minuten gekocht, zum Abkühlen dann ins Wasserbad gestellt.

Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3%ige H₂O₂ Lösung getaucht, um die endogene Gewebssperoxidase in den Schnitten zu inaktivieren. Danach wurden die Objektträger erneut in Aqua bidest. und TBS Puffer für 10 Minuten gewaschen, um das H₂O₂ zu entfernen und den pH-Wert erneut zu äquilibrieren. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig

abgetropft und die Objektträger auf Filterpapier geblottet. Die Schnitte wurden danach aus den Färbe-Körben entnommen und nebeneinander auf eine Platte gelegt. Mit einem Fettstift (DAKO Pen) wurden die Schnitte umfahren, damit die folgenden Lösungen sich nur auf dem Präparat verteilen (hydrophobe Abgrenzung) und nicht auf dem gesamten Objektträger. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden 2-3 Tropfen unverdünntes Sea-Block Reagenz (Pierce) auf die Schnitte getropft und 10 Minuten inkubiert und anschließend dekantiert.

Die Primärantikörper gegen die jeweiligen Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren wurden in TBS verdünnt (Verdünnung siehe Angaben für den jeweiligen Antikörper, **Tab. 6**). Jeder Schnitt wurde mit 200 µl Lösung überschichtet und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde mit TBS Puffer gewaschen und der jeweilige sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen, beide von Jackson Immuno Research) in der Verdünnung 1:500 dazugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde bei Kontrollpräparaten nur der sekundäre Antikörper eingesetzt bzw. unspezifische, nicht-bindende Antikörper der jeweiligen Spezies verwandt. Danach wurde erneut dreimal mit TBS gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde anschließend mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Dianova, 1:250 in TBS verdünnt) für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen mit TBS wurde zur immunchemischen Färbung des gebundenen Peroxidase-Komplexes Diaminobenzidin (Pierce; DAB/Metalloclone) 1:10 verdünnt in Stable Peroxidase Substrat Puffer (Pierce) hinzugeben. Die Färbereaktion wurde für 5-10 Minuten inkubiert und anschließend mit Aqua bidest. gestoppt. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt. Zur Dehydrierung wurden danach die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe (50%, 70%, 80%, 96%, reiner Alkohol) für 3-5 Minuten eingetaucht. Danach wurden die Objektträger in Xylol getaucht und anschließend mit Objektgläsern (ClariOn, Natutek) eingedeckt.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte lichtmikroskopisch. Die Analysen wurden von 2 unabhängigen Beobachtern ohne Wissen der klinisch-pathologischen Daten durchgeführt. Diese Auswertungen zeigten eine hohe Interbeobachter-Korrelation (Pearson's Korrelationskoeffizient: 0.926, Fisher's r zu z Transformation: $p < 0.0001$). Diskordante Fälle wurden gemeinsam durch beide Beobachter nachbegutachtet um Konsens zu erzielen.

Tab. 6: In der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
Rb	G3-245	Maus	IgG	monoklonal	Pharmingen	1:500
p53	DO-7	Maus	IgG	monoklonal	Dako	1:75
p16	G124-405	Maus	IgG	monoklonal	Pharmingen	1:150
p21	6B6	Maus	IgG	monoklonal	Pharmingen	1:75
p27	G173-524	Maus	IgG	monoklonal	Pharmingen	1:100
Cyclin D1	G124-326	Maus	IgG	monoklonal	Pharmingen	1:75
Cyclin E	HE12	Maus	IgG1	monoklonal	Pharmingen	1:75
Bax	Ab-1	Kaninchen	IgG	polyklonal	Oncogene Research	1:50
Bcl-2	124	Maus	IgG	monoklonal	Dako	1:200
Ki-67	MIB-1	Maus	IgG	monoklonal	Dianova	1:200

Vier hochvergrösserte (400x) Gesichtsfelder wurden ausgewertet bezüglich der Prozentzahl positiv gefärbter Zellen (0-100% in 5% Schritten für Bax und p53, in 10% Schritten für die übrigen Proteine und der Färbe-Intensität (0 bis +++). Für die folgenden Auswertungen wurden die positiven Zellen in Prozent und auch das Produkt aus der Intensität und Prozentzahl gefärbter Zellen (Färbeindex) berücksichtigt. Die Ergebnisse beider Methoden wurden miteinander verglichen.

Der Prozentsatz positiver Zellen korrelierte gut mit dem Färbeindex: Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) und die Signifikanzniveaus (p Werte berechnet durch Fisher's r zu z Transformation) betragen: für p16^{INK4a}: r=0.901, p<0.0001, für Cyclin D1: r=0.811, p<0.0001 und für Bax: r=0.934, p<0.0001. Aus Gründen der Vereinfachung und klareren Darstellung der Daten werden daher für alle Darstellungen nur die Prozentwerte positiv angefarbeter Zellen dargestellt.

3.3 Extraktion genomischer DNA aus Tumorproben

Genomische DNA wurde aus den Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Tumorproben gewonnen. Hierzu wurden 30 µM dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden anschliessend in N-Oktan deparaffiniert und anschliessend rehydriert. Hiernach wurde die

DNA mit Hilfe des Invisorb Spin Tissue Kits (Invitek) extrahiert. Hierzu wurden die Proben über Säulen aus hochdispersen Silikatpartikeln gegeben, die eine effiziente Adsorption der genomischen DNA Fragmente gewährleisten. Zur Lagerung wurde die DNA in 10 mM Tris HCl/0.1 mM EDTA Puffer (pH 8.7) eluiert und bei -20°C weggefroren.

3.4 p53 Mutationsanalyse

Zur p53-Mutationsanalyse wurden die Exons 5 bis 8 des p53 Gens aus genomischer DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. DNA aus Formalin-fixiertem Gewebe ist stark degradiert. Dies gestattet zuverlässig nur die Amplifikation kurzer DNA Fragmente von maximal ca. 200 Basenpaaren Länge. Aus diesem Grund wurde das Exon 5 in 2 PCR Reaktionen amplifiziert (Exon 5a und 5b). Hierzu wurden die in **Tabelle 7** gezeigten Primerpaare eingesetzt.

Für die PCR-Reaktion wurden zuvor beschriebene Standardprotokolle eingesetzt^{137, 174} unter Verwendung der Taq Polymerase (Invitek). Die Amplifikation erfolgte mittels eines Thermocyclers der Fa. Applied Biosystems (Modell 2400) unter folgenden Bedingungen für **Exon 5a**: Denaturierung bei 94°C für 5 min. gefolgt von 35 Zyklen bei 94°C für 30 s, 55°C für 20 s, 72°C für 15 s; **Exon 5b**: 94°C für 5 min. gefolgt von 35 Zyklen bei 94°C für 30 s, 65°C für 20 s min, 72°C für 15 s; **Exon 6**: 94°C für 5 min. gefolgt von 35 Zyklen bei 94°C für 30 s, 60°C für 20 s min, 72°C für 15 s; **Exon 7**: 94°C für 5 min. gefolgt von 35 Zyklen bei 94°C für 30 s, 58°C für 20 s min, 72°C für 20 s; **Exon 8**: 94°C für 5 min. gefolgt von 35 Zyklen bei 94°C für 30 s, 60°C für 20 s min, 72°C für 15 s.

Sequenzaberrationen in den PCR-Amplifikaten wurden mittels SSCP-PCR (single stranded conformational polymorphism PCR) nachgewiesen¹⁷⁵. Hierzu wurden 5 μl des PCR Amplifikats in 7 μl Ladepuffer (82% Formamid, 10 mM NaOH, 50 mM EDTA, Bromphenolblau und Xylenyanol (Merck)) gemischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert um die Trennung in DNA Einzelstränge zu erreichen. Anschliessend wurden die Proben auf Eis gestellt, um sie herunterzukühlen und sequenzspezifische Renaturierung der Einzelstränge zu erreichen. Diese denaturierten Fragmente wurden dann in 10%-igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen (Merck) bei 500V Spannung und 50 mA Stromstärke für 2 Stunden bei 10°C in einer Multiphor-Elektrophoresekammer (Pharmacia) aufgetrennt. Die separierten DNA Fragmente wurden wie beschrieben in den Gelen mittels Silberfärbung

dargestellt. Nach Trocknung der Gele erfolgte die optische manuelle Auswertung und Suche nach aberranten Bandenmustern.

Tab. 7: Für die p53-Mutationsanalyse eingesetzte Primer

Exon	Primer	Codon	Basenpaare
Exon 5a	Vorwärts: CCA GTT GCT TTA TCT GTT CA Rückwärts: TGT GGA ATC AAC CCA CAG	126 - 150	139
Exon 5b	Vorwärts: CAA CTG GCC AAG ACC TGC Rückwärts: AAC CAG CCC TGT CGT CTC T	134 - 186	191
Exon 6	Vorwärts: CTC TGA TTC CTC ACT GAT TGC Rückwärts: GAG ACC CCA GTT GCA AAC CA	187 - 224	163
Exon 7	Vorwärts: TTG CCA CAG GTC TCC CCA A Rückwärts: AGG GTG GCA AGT GGC TCC	225 - 261	190
Exon 8	Vorwärts: CCT TAC TGC CTC TTG CTT C Rückwärts: CGC TTC TTG TCC TGC TTG C	262 - 306	199

3.5 K-ras Mutationsanalyse

Punktmutationen des Codons 12 des Protoonkogens K-ras wurden mit Hilfe eines sequenzspezifischen Festphasen-Hybridisierungstests (Invitek) zur spezifischen Detektion mutierter Allele in Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA in einer ersten PCR mit Hilfe der folgenden Primer (Biotez) amplifiziert:

Vorwärts-Primer: 5' AAC-TTG-TGG-TAG-TTG-GAG-CT-3'

Rückwärts-Primer: 5' -GTT-GGA-TCA-TAT-TCG-TCC-AC-3'

Zur Anreicherung von mutierten K-ras Sequenzen wurde wie beschrieben eine enzymatische Spaltung der Wildtyp-K-ras Amplifikate durchgeführt^{176, 177} Wildtyp K-ras enthält eine BstNI Restriktionsschnittstelle die durch Punktmutation des Codons 12 zerstört wird. Durch diesen Anreicherungsschritt wird eine Empfindlichkeitssteigerung der Detektion von mutiertem K-ras um zwei Zehnerpotenzen erreicht. Gleichzeitig wird der Anteil von Wildtyp K-ras im Hybridisierungsansatz (s.u.) erreicht und der Hintergrund unspezifischer Hybridisierungen drastisch vermindert.

Nach dieser initialen genomischen PCR und BstNI-Verdau wurde das resultierende PCR-Produkt in einer zweiten PCR weiteramplifiziert mit Hilfe des gleichen Vorwärts- und eines sequenzidentischen, aber biotinylierten Rückwärts-Primers.

Die PCR-Amplifikate wurden anschliessend 1:100 verdünnt und 50 µl wurden in Löcher einer Streptavidin-beschichteten 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert (Hoffmann-LaRoche/Boehringer Mannheim) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Anhaftung der biotinylierten PCR-Amplifikate an die Festphase der Platte zu erlauben. Anschliessend wurde 0.2 M NaOH (Merck) zugegeben, um die Amplifikate in Einzelstränge zu denaturieren. Nach 15 Minuten Inkubation wurde 3-mal mit 1 x PBS/0.1% Tween-20 gewaschen, um ungebundene DNA zu entfernen und den pH-Wert zu äquilibrieren. Die einzelsträngigen, an die Festphase gebundenen Amplifikate wurden anschliessend mit 3 pmol 5'-Digoxigenin-markierter Proben inkubiert, die aus entsprechenden Sequenzabschnitten des K-ras Codons 12 bestehen, und zwar für Wildtyp des Codon 12 kodierend für Glycin (GGT) oder mutiertes Codon 12: Alanin (GCT), Arginin (CGT), Aspartat (GAT), Cystein (TGT), Serin (AGT) bzw. Valin (GTT). Anschliessend wurden die Platten gewaschen und mit Peroxidase-markiertem Anti-Digoxigenin-Antikörper (Hoffmann-LaRoche/Boehringer Mannheim) inkubiert, erneut gewaschen und dann das chromogene Substrat BMT hinzugegeben. Nach Abstoppen der Farbreaktion mit Schwefelsäure wurde das Hybridisierungsergebnis mit Hilfe eines Plattenphotometers analysiert^{176, 178}.

Als Positivkontrolle wurde genomische DNA der Kolonkarzinomzelllinie SW480 und als Negativkontrolle genomische DNA aus peripheren Blutleukozyten gesunder Spender eingesetzt.

3.6 Statistische Auswertung

Das Gesamtüberleben wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Produktlimit-Methode geschätzt ab Zeitpunkt der Operation. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte mittels des Log-Rang Mantel-Cox Tests. Uni- und multivariate Analysen wurden mittels des Cox-Proportionalen Risiko-Modells berechnet. Die Mehrzahl der Parameter wurde als dichotomisierte (kategoriale) Variablen eingesetzt. Verglichen wurde T-Stadium T3 und T4 versus T1 und T2, N-Stadium N1 versus N0, UICC Stadium I und II versus III (Stadium IV war aufgrund der Tatsache, dass nur Patienten ohne Fernmetastasen und lokal wenig fortgeschrittenen Tumoren mit kurativer Chance eingeschlossen waren, nicht im Studienkollektiv vertreten), Grading G1 und G2 versus G3, Alter über versus Alter kleiner gleich Median, zusätzliche adjuvante

Bestrahlung bzw. Radiochemotherapie ja versus nein, Geschlecht: männlich versus weiblich, Art der Operationstechnik: transthorakal versus transhiatal, p53 Mutation oder K-ras Mutation ja versus nein.

Aufgrund einer früheren Arbeit in kolorektalen Karzinomen¹³⁷ wurden die Expressionsdaten für das p53 und Bax Protein in der immunhistochemischen Analyse folgendermassen definiert: $\geq 20\%$ gefärbte Tumorzellen wurde als "hohe Expression" oder "positiv", $< 20\%$ gefärbte Tumorzellen wurde als "niedrige Expression", oder "negativ" gewertet.

Für p16^{INK4a}, fanden wir in einer früheren Studie einen Grenzwert von 70% ($< 70\%$ gefärbte Tumorzellen wurde als "niedrige Expression", $\geq 70\%$ als "hohe Expression" eingestuft. Ein vergleichbarer Grenzwert wurde unabhängig von einer anderen Gruppe definiert¹⁷⁹. Im Fall von Rb wurde in Anlehnung an p53 und Bax ebenfalls ein Grenzwert von 20% gesetzt und Tumore mit $\geq 20\%$ angefarbter Tumorzellen wurden als "Rb-positiv" eingestuft. Im Hinblick auf die geringe Zahl für p21^{CIP/WAF-1} und Bcl-2 anfärbbarer Zellen wurde zwischen fehlender Expression (p21^{CIP/WAF-1} oder Bcl-2 negativ) versus $> 0\%$ positive Zellen kategorisiert. Cyclin D1 Überexpression wurde als Cyclin D1 expression in $> 60\%$ der Tumorzellen definiert. Dieser Grenzwert wurde aufgrund einer „Kerbe“ in der Häufigkeitsverteilung der Tumorzellen mit nukleärer Cyclin D1 Expression definiert als Hinweis auf das Vorhandensein einer distinkten Population von Tumoren mit höherem Cyclin D1 Expressionsniveau. Nukleäre Cyclin E und p27 Expression wurden aufgrund einer solchen 2-gipfligen Verteilung, die zudem mit dem Median koinzidierte, am Median dichotomisiert ($\leq 5\%$ positive Zellen für p27 und $\leq 30\%$ positive Zellen Cyclin E versus grösser Median).

Um Patientengruppen in „intakt“ bzw. „defizient“ zu dichotomisieren wurde die Interaktionsvariable eingesetzt. Die Interaktionsvariable ist definiert als Multiplikationsprodukt kategorialer Variablen, wobei „intakte“ Genotypen als „1“ gesetzt wurden, „defiziente“ hingegen als „0“. Hierdurch wurden alle Patienten bei denen alle untersuchten Parameter „intakt“ waren durch den Wert „1“ der Interaktionsvariablen definiert und kategorisiert. Für alle anderen Patienten (mit einem oder mehreren Defekten der in der Analyse enthaltenen Parameter) wurde hingegen ein Wert „0“ der Interaktionsvariable errechnet.

Univariate Analysen bezüglich des Gesamtüberlebens wurden mittels Berechnung des Proportionalen Risiko-Modells für jeden Parameter einzeln durchgeführt. Für den Vergleich

von Variablen untereinander wurden, je nach Fall, der Mann-Whitney U-Test für nicht normalverteilte kontinuierliche Variablen bzw. für kategoriale Variablen der χ^2 -Test oder Fisher's exakter F-Test eingesetzt. Für die multivariate Regressionsanalyse wurde das Proportionale Risiko-Modell nach Cox sowohl vor- als auch rückwärts entwickelt zur schrittweisen Selektion bzw. Elimination kategorialer Variablen basierend auf Veränderungen der Wahrscheinlichkeitsinteraktion zwischen den verschiedenen Parametern.

Sämtliche statistische Analysen wurden mittels des Statview 5 Softwarepakets der Firma SAS für Apple Macintosh Rechner durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Nachbeobachtung

Analysiert wurden 53 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, bei denen in kurativer Absicht eine R0-Resektion durchgeführt wurde. Die Daten bezüglich Alter, Geschlecht, Stadium, Grading, Art der Operation und evtl. nachfolgender adjuvanter Radio- bzw. Radiochemotherapie sind in **Tabelle 5** dargestellt. Am Ende der Nachbeobachtungszeit waren noch 9 von 53 Patienten (17%) am Leben. Das mediane Follow-up nach Ösophagektomie für diese 9 zensierten Patienten betrug 48 Monate (Range 24-144 Monate). Das mediane Gesamtüberleben bezogen auf das gesamte Kollektiv lag bei 13,7 Monaten. Nach Korrektur für die 30-Tage-perioperative Mortalitätsrate betrug die 1-, 2-, und 5-Jahres-Überlebensrate 52%, 24% beziehungsweise 17%.

4.2 Analyse des Rb-Signalwegs

Die immunhistochemisch bestimmten Daten zur Proteinexpression sind in **Abbildung 11** dargestellt. Gezeigt ist (1) der Prozentsatz angefärbter Tumorzellen im Gewebsschnitt (**Abb. 11A**) und (2) der Färbeindex (FI, **Abb. 11B**), der durch Multiplikation der Prozentzahl angefärbter Zellen mit der Färbeintensität (negativ, einfach bis dreifach positiv) errechnet wurde¹⁸⁰. Expressionsdaten konnten für alle 53 Patienten für p16, p21, p53, Bax, für Rb und Cyclin D1 in 52 und für Bcl-2 in 51 Tumorproben erhoben werden.

Die immunhistochemische Analyse des Rb-Proteins im Karzinomgewebe zeigte eine breite Variabilität der Expression mit einer vorwiegend nukleären Färbung. Der Median der nukleären Rb-Expression lag bei 52.2% positiver Zellen (Interquartil-Range 47.5%) und 110 für den FI (arbiträre Einheit, Interquartil-Range 165). Der Prozentsatz positiver Zellen und der FI zeigten eine ähnliche Verteilung. Dies weist darauf hin, dass Rb-positive Zellen insgesamt ein hohes Expressionsniveau aufweisen. Sieben der Tumore zeigten Rb Expression unter 20% positive Zellen und wurden als Rb-negativ kategorisiert.

Die nukleäre Cyclin D1 Expression zeigte einen Median von 30% positiver Zellen (Interquartil-Range 35%) mit einem Median des FI von 30 (Interquartil-Range von 62.5,

Abb. 11). Dies weist auf eine möglicherweise niedrigere Expression im Vergleich zu Rb hin. Dreißig Tumore zeigten Cyclin D1 Expression unter 60% Cyclin D1-positiver Zellen und wurden als niedrig exprimierend eingestuft. Die restlichen 9 Tumore wurden als Cyclin D1 überexprimierend klassifiziert.

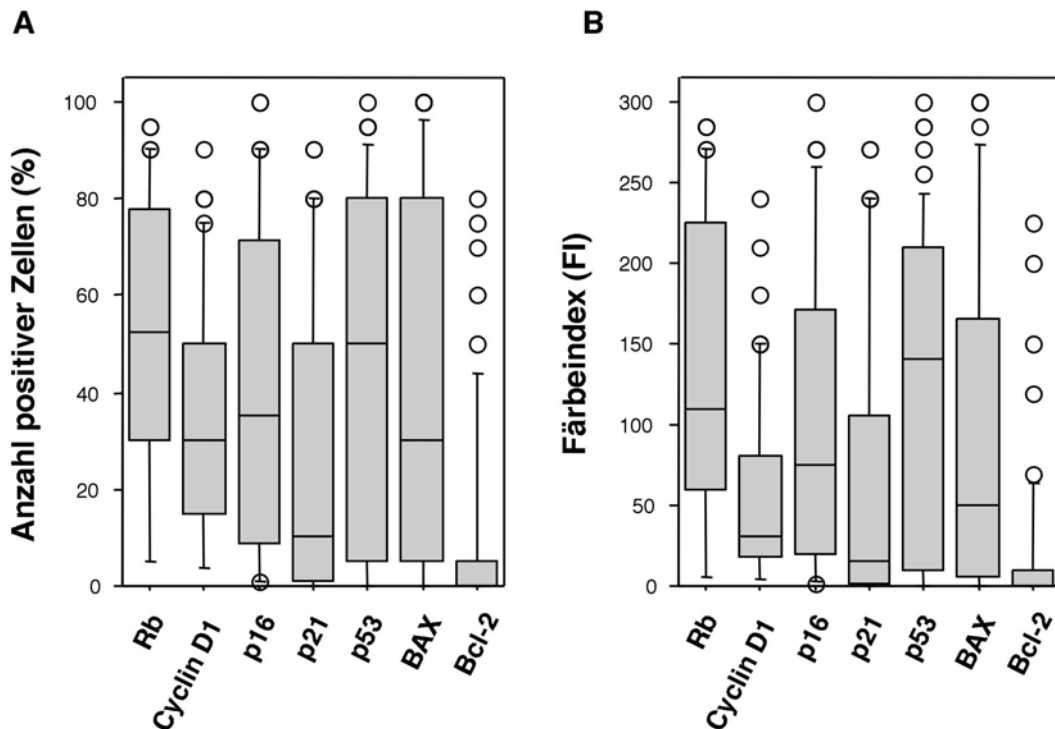


Abb. 11: *Expressionsniveau von Komponenten des Rb-Signalwegs, Bax und Bcl-2, analysiert mittels Immunhistochemie*

Gezeigt sind Box-Grafiken für (A) den Prozentsatz positiver Zellen bzw. (B) den Färbeindex (FI).

Nukleäre p16^{INK4} Expression zeigte einen medianen Prozentsatz angefärbter Tumorzellen von 35.0% (Interquartil-Range von 62.5%) mit einem medianen FI von 75.0 (Interquartil-Range 150.0). Sechsunddreissig Tumore zeigten weniger als 70% p16-exprimierende Zellen und wurden als p16-niedrig exprimierend kategorisiert.

Abbildung 12 zeigt eine repräsentative immunhistochemische Färbung für Expression des CDK Inhibitors p16^{INK4a}. Diese Abbildung zeigt als Nebenbefund gesundes nicht-

verhornendes Plattenepithel der Ösophagusschleimhaut, das durch den Tumor unterwandert und interstitiell infiltriert wurde und eine deutlich geringere p16 Färbung aufweist.

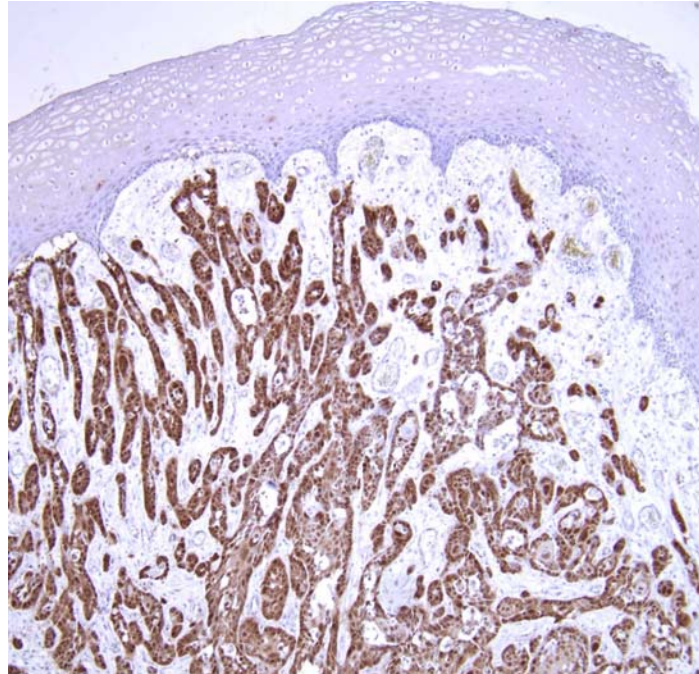


Abb. 12: Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

Normale Ösophagusschleimhaut (oberer Bildrand) wird durch Plattenepithelkarzinomzellen unterwandert. Angefärbt wurde $p16^{INK4a}$ das ein vorwiegend nukleäres Expressionsmuster zeigt.

Die Immunhistochemie für $p21^{CIP/WAF-1}$ zeigte eine generell niedrige Expression im Vergleich zu den anderen Zellzyklusregulatoren. Der mediane Prozentsatz der nukleären p21 Expression lag bei 10.0% (Interquartil-Range 49%) und für den medianen FI bei 15 (Interquartil-Range 103.0). Neun Tumore zeigten keinerlei p21 Expression und wurden als p21-negativ klassifiziert.

Der mediane Prozentsatz für nukleäre Überexpression von p53 lag bei 50% (Interquartil-Range 75.0%) mit einem medianen FI von 140.0 (Interquartil-Range 200.0). Zehn der 53 Ösophaguskarzinome zeigten keinerlei p53 Expression, 4 der 53 Tumore zeigten weniger als 20% p53-exprimierende Zellen. Diese insgesamt 14 Tumore wurden als p53-negativ definiert.

Der mediane Prozentsatz Bax exprimierender Tumore betrug 30% (Interquartil-Range 75%) mit einem medianen FI von 50 (Interquartil-Range 140.0). Zehn der 53 Tumore zeigten keinerlei Bax Expression und 11 Tumore zeigten Bax Expression in weniger als 20% der Tumorzellen. Diese 21 Tumore wurden als Bax-negativ klassifiziert.

Im Fall von Bcl-2 zeigte sich eine generell niedrige Expression. Demzufolge wurde der Median der Bcl-2 Expression bei 0% positiver Zellen bzw. einem FI von 0 bestimmt. Der Mittelwert des Prozentsatzes positiver Zellen betrug 10.3%. Achtundzwanzig der 51 messbaren Tumore zeigten keinerlei Bcl-2 Expression und die verbleibenden 23 Tumore wurden als Bcl-2 positiv kategorisiert.

4.3 Mutationsanalyse von p53 und Bax in Relation zu Protein-Expressionsprofilen

Die p53 Mutationsanalyse wurde nach Extraktion der genomischen DNA aus dem Paraffin-eingebetteten Gewebe mittels SSCP-PCR für die Exons 5 bis 8, also die DNA-Bindungsdomäne, durchgeführt. In diesem Bereich sind mindestens 95% der p53-Mutationen lokalisiert. In 12 der 53 Tumore wurden insgesamt 21 Mutationen nachgewiesen: eine in Exon 5, zwei in Exon 6, 5 in Exon 7 und 13 in Exon 8.

Im Hinblick auf frühere Berichte, dass p53 Mutation mit Überexpression des p53 Proteins korrelieren soll, wurden p53 Mutationsstatus und Expression des p53 Proteins korreliert. In Übereinstimmung mit früheren Berichten^{137, 180-182} wurde allerdings kein Zusammenhang zwischen p53 Mutation und Expressionsniveau des p53 Proteins gefunden (**Abb. 13**). Das Expressionsniveau von p53 war geringfügig, aber nicht signifikant, in p53 mutierten Tumoren erhöht (Mann-Whitney U-Test, $p = 0.195$).

P53 ist ein transkriptioneller Aktivator des Bax-Gens. Zu klären war daher, ob die Inaktivierung von p53 durch Mutation mit dem Bax-Expressionsverlust korreliert. Überraschenderweise war das Expressionsniveau von Bax in den p53 mutierten Tumoren nicht vermindert ($p = 0.633$). Dies lässt vermuten, dass p53 nicht der entscheidende Aktivator des Bax-Gens ist und dass noch weitere, wichtigere Faktoren das Bax Gen regulieren.

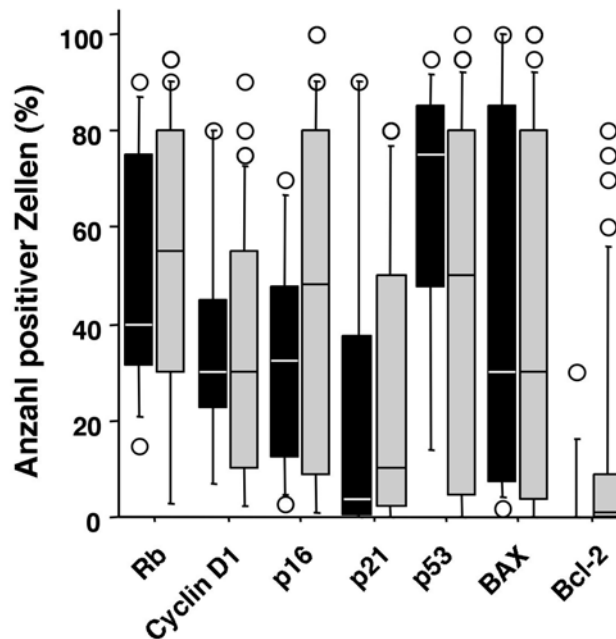


Abb. 13: *Expressiospiegel der untersuchten Gene in Relation zum p53 Mutationsstatus*

Die Box-Grafiken zeigen den Prozentsatz positiver Zellen. Schwarze Boxen: p53-mutierte Tumore; graue Boxen: p53 Wildtyp-Tumore.

Eine weitere mögliche Ursache für den Expressionsverlust von Bax wurden in einer früheren Untersuchung Framehift-Mutationen des G8-Trakts im Exon 3 des Bax Gens bestimmt. Durch Verrutschen des Leserasters werden durch solche Mutationen prämatüre Stopcodons eingefügt, so dass es zur Produktion trunkierter, nicht funktionsfähiger und auch nicht mittels der verwendeten Antikörper nachweisbarer Bax-Proteine und somit zum Expressionsverlust von Bax kommt. Im Gegensatz zu kolorektalen¹³⁷ und Magenkarzinomen¹⁸³ fanden sich keine Bax Frameshift-Mutationen, so dass dieser Mechanismus als kausales Prinzip für den Verlust der Bax-Expression bei Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen ausgeschlossen werden kann.

In Analogie zu Bax waren die Proteinspiegel des p21^{CIP/WAF-1} Proteins in den p53 mutierten Tumoren nur grenzwertig vermindert (Mann-Whitney U-Test, $p = 0.334$). Dies lässt vermuten, dass weitere Regulatoren an der Aktivierung der Expression des p53-Zielgens p21 beteiligt sind.

In früheren Untersuchungen wurde zudem p53 als direkter bzw. indirekter transkriptioneller Repressor des *bcl-2* Gens beschrieben. Somit wäre in den p53 mutierten Tumoren eine

erhöhte Bcl-2 Proteinexpression zu erwarten. Im Gegensatz hierzu wurde in der vorliegenden Untersuchung ein leicht vermindertes Expressionsniveau des Bcl-2 Proteins in den p53-mutierten Tumoren beobachtet, das jedoch nicht signifikant erniedrigt war ($p = 0.068$).

Insgesamt konnte somit für kein einziges der untersuchten Gene ein signifikant vermindertes oder erhöhtes Proteinexpressionsniveau in Abhängigkeit des p53 Mutationsstatus beobachtet werden.

4.4 Korrelation von Expressionsprofilen mit klinischen und pathologischen Parametern

Im nächsten Schritt wurde die Beziehung von klinischen und pathologischen Parametern mit p53 Mutation und Expressionsprofilen der immunhistochemisch untersuchten Gene analysiert. Die Expressionsspiegel von Rb, Cyclin D1, p16, p21, p53, Bax und Bcl-2 wurden hierbei als kontinuierliche Variablen mit den dichotomisiert kategorisierten Variablen für Tumorstadium, Grading und N-Status mit Hilfe des ungepaarten Mann-Whitney U-Tests analysiert (**Abb. 14**).

Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den klinisch-pathologischen Subgruppen und p53 Mutation bzw. der Expression von Bax, p53 und p16 (χ^2 -Test, $p > 0.05$). Die Expression von Bax war geringfügig niedriger in G1/2 Tumoren im Vergleich zu Tumoren mit G3 Grading. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test, $p = 0.071$, **Abb. 14B**).

Das Expressionsniveau des Rb Proteins zeigte keinerlei Bezug zu Nodalstatus, Tumogrösse bzw. Stadium (I bis III). Im Gegensatz hierzu zeigte Cyclin D1 ein höheres Expressionsniveau in N1-Tumoren, was allerdings auch nicht signifikant war (**Abb. 14A**; $p = 0.114$).

Interessant war, dass das Vorhandensein lokaler Lymphknotenmetastasen (N1) signifikant mit einem Verlust der p21 Expression assoziiert war (**Abb. 14A**; $p=0.039$). Bezüglich des p53 Mutationsstatus fand sich ein solcher Bezug allerdings nicht. Im Gegensatz zu p21 zeigte das anti-apoptotische Bcl-2, wie auch Bax, keine signifikante Assoziation mit den getesteten klinisch-pathologischen Parametern.

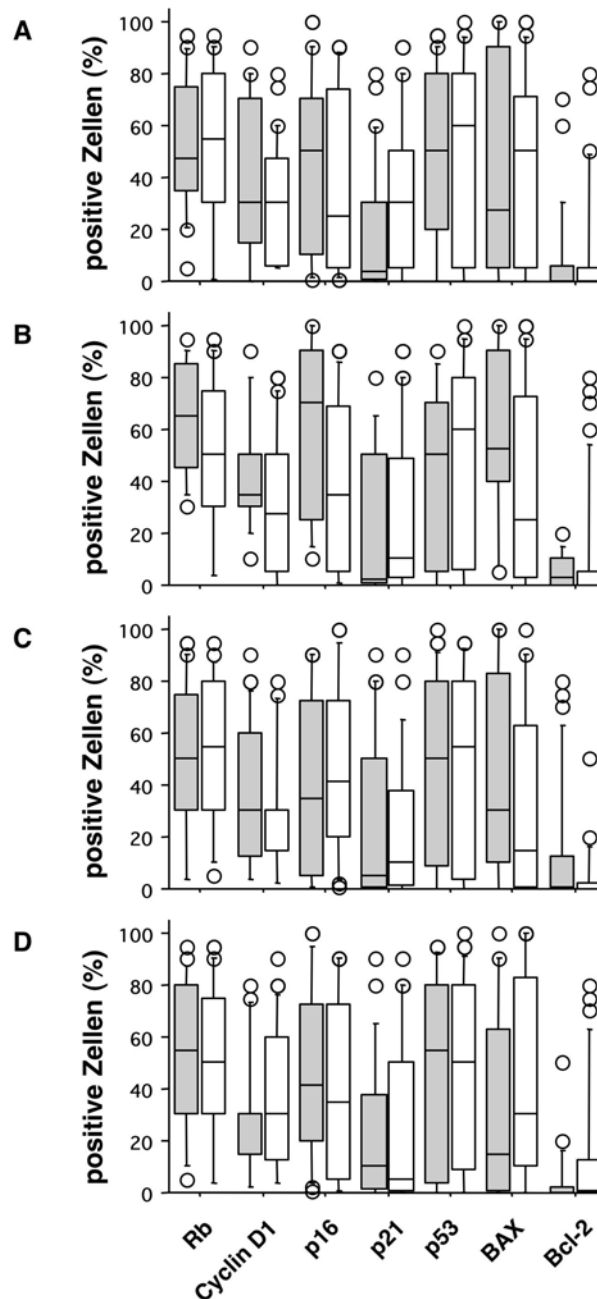


Abb. 14: Immunhistochemisch bestimmte Expressionspiegel von Komponenten des Rb-Signalwegs, Bax und Bcl-2 in Relation zu klinisch-pathologischen Parametern

Gezeigt sind Box-Grafiken für den prozentualen Anteil positiver Zellen.

- A: Nodalstatus, N0 (weisse Boxen) versus $N \geq 1$ Stadium (graue Boxen)
- B: Tumor-Grading, G1/G2 (weisse Boxen) versus G3 Grading (graue Boxen)
- C: T Stadium (Grösse), T1/2 (weisse Boxen) versus T3/4 Tumore (graue Boxen)
- D: AJCC Stadium, Stadium I/II (weisse Boxen) versus Stadium III (graue Boxen).

Fünfzehn der Patienten erhielten zusätzlich zur Operation eine Strahlen- bzw. kombinierte Radiochemotherapie. Diese Patienten zeigten keine signifikanten Verteilungsunterschiede

bezüglich Bax-positiver (7 von 21 erhielten zusätzliche Therapie) bzw. Bax-negativer Tumore (8 von 32 erhielten zusätzliche Therapie). Ebenso zeigte sich kein Unterschied für p16 hochexprimierende (6/17) und niedrig exprimierende Tumore (9/36), Rb positive (13/45) versus Rb negative (1/7), Bcl-2 negative (8/28) versus Bcl-2 positive (7/23), p21 negative (2/9) versus p21 positive (13/44) und Cyclin D1 überexprimierende (4/9) versus Cyclin D1 niedrig exprimierende (11/43) Tumore (Fisher's exakter Test $p > 0.3$ für alle Variablen).

4.5 Einfluß von Cyclin D1, p16^{INK4a}, Rb, p53, p21, Bax und Bcl-2 auf das Überleben

Um den Einfluss von Cyclin D1, p16^{INK4a}, Rb, p21^{CIP/WAF-1}, p53, Bax and Bcl-2 Proteinexpression und p53 Mutation auf die Krankheitsprognose zu bestimmen, wurden univariate Analysen für den Einfluss der einzelnen Faktoren auf das Gesamtüberleben durchgeführt. Die Patienten wurden hierfür mit Hilfe dichotomisierter Variablen stratifiziert (vgl. Material und Methoden). Es wurden folgende Gruppen gebildet: Rb hoch- versus niedrig exprimierend/negativ, Cyclin D1 niedrig exprimierend versus überexprimierend, p16 hoch- versus niedrig exprimierend, p21 positiv versus negativ, p53 positiv versus negativ, Bax positiv versus negativ, Bcl-2 positiv versus negativ und p53 Wildtyp versus p53 mutiert.

Die Analyse wurde mit den Genen begonnen, die den Fortschritt der Zelle im Zellzyklus aus der G1 in die S-Phase kontrollieren: Rb, Cyclin D1 und der Cyclin-abhängige-Kinase Inhibitor p16^{INK4a}.

In der univariaten Analyse zeigten Patienten mit Tumoren, die wenig Cyclin D1 exprimieren, aber p16 und Rb hoch exprimieren ein deutlich besseres Gesamtüberleben (**Abb. 15**). Das mediane Gesamtüberleben betrug 15.0 Monate für Patienten mit Cyclin D1 niedrig exprimierenden Tumoren, jedoch nur 5.8 Monate für Patienten mit Cyclin D1 überexprimierenden Tumoren (Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0.034$, **Abb. 15A**).

Patienten mit hoher p16^{INK4a} Expression in ihren Tumoren zeigten ein medianes Überleben von 23.8 Monaten versus 9.7 Monate für diejenigen mit p16 niedrig exprimierenden Tumoren (Log-Rang Mantel-Cox Test: $p=0.011$; **Abb. 15B**).

Schließlich zeigten Patienten mit extremem Verlust der Rb Expression ein medianes Überleben von 8.3 Monaten im Vergleich zu 13.9 Monaten für Patienten mit Rb hoch exprimierenden Tumoren ($p = 0.202$, nicht signifikant; **Abb. 15C**).

Insgesamt diskriminieren alle drei Analysen zwischen Patienten mit längerem Überleben und solchen, die früh versterben. Allerdings erreichte dies im Fall von Rb keine statistische Signifikanz.

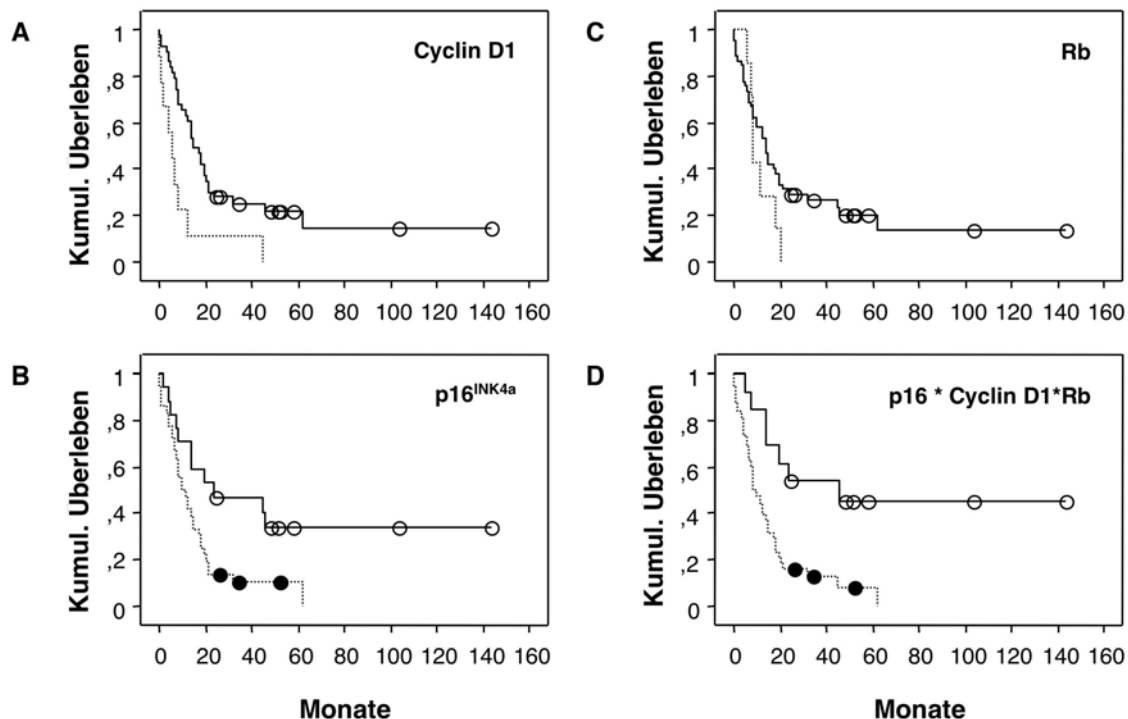


Abb. 15: Kaplan-Meier Überlebensanalyse für Cyclin D1, p16^{INK4a}, Rb und den kombinierten Cyclin D1/p16/Rb Status

A: Cyclin D1 niedrig exprimierende (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Cyclin D1 überexprimierende Tumore (gestrichelte Linie; Cut-off Punkt für Cyclin D1 Überexpression: nukleäre Cyclin D1 Expression in > 60% der Tumorzellen),

B: p16^{INK4a} hoch exprimierende (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus p16^{INK4a} niedrig exprimierende Tumore (gestrichelte Linie und schwarze Kreise; Cut-off Punkt für hohe p16 Expression: nukleäre p16 Expression in $\geq 70\%$ der Tumorzellen),

C: Rb positive (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Rb negative Tumore (gestrichelte Linie und schwarze Kreise; Cut-off Punkt für Verlust der Rb Expression: nukleäre Rb Expression in < 20% der Tumorzellen),

D: Cyclin D1 niedrig/p16 hoch/Rb positive Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Tumors mit einem oder mehreren Defekten in der Genexpression (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

Zensierungsereignisse sind mit Kreisen gekennzeichnet.

Zusätzlich zu diesen Einzelgen-Analysen wurde hinterfragt, ob die kombinierte Analyse aller drei Gene die prognostische Relevanz der drei Gene und die Diskriminierung zwischen guter versus schlechter Prognose verbessern kann. Hierfür wurde die Interaktionsvariable der dichotomisierten Variablen berechnet (Cyclin D1 * p16 * Rb), wobei Cyclin D1^{niedrig}, p16^{INK4a hoch} bzw. Rb^{hoch} als „1“, d.h. „intakt“ und Cyclin D1^{hoch}, p16^{INK4a niedrig} bzw. Rb^{negativ} als „0“, d.h. „defekt“ gesetzt wurden.

Hierdurch wurden die Patienten in 2 Gruppen mit „günstigem“ versus „ungünstigem“ Risikoprofil kategorisiert. Durch diese statistische Prozedur wurden Patienten mit intakter Gen-Expression von solchen unterschieden, die einen oder mehrere Defekte der analysierten Gene tragen. Tatsächlich zeigt die Abbildung 4D, dass Patienten mit Cyclin D1^{niedrig}, p16^{INK4a hoch} und Rb^{hoch} Expression (13 von 51 Patienten) ein medianes Überleben von 45.8 Monaten zeigten im Vergleich zu nur 8.3 Monaten für Patienten mit Cyclin D1^{hoch} und/oder p16^{INK4a niedrig} und/oder Rb^{negativ} Expressionsprofil ($p = 0.019$).

Im Gegensatz hierzu waren weder p53 Mutation (**Abb. 16A**) noch p53 Überexpression (nicht gezeigt) signifikant mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Dennoch wurde der Einfluss der p53 Mutation auf molekulare Subgruppen mit zusätzlichen Defekten von Zellzyklus- bzw. Apoptose-regulierenden Genen bestimmt. **Abbildung 16A** zeigt, dass p53 Mutation alleine nur grenzwertig mit einem schlechteren Überleben verbunden ist. Es befanden sich alle Patienten mit Langzeitüberleben in der p53-Wildtyp-Gruppe. Das mediane Überleben von Patienten mit p53 Wildtyp-Tumor betrug allerdings nur 12.2 Monate im Vergleich zu 13.9 Monaten für Patienten mit p53-mutiertem Tumor. Dieser Unterschied im Überleben war nicht signifikant (Logrank Test, $p = 0.6274$).

Im Gegensatz zu p53 zeigte die Analyse der p21^{CIP/WAF-1} Expression einen Unterschied im Gesamtüberleben der beiden Gruppen wobei Patienten mit p21-Verlust eine schlechtere Prognose zeigten (**Abb. 16B**). Patienten mit Tumoren, die einen kompletten Verlust der p21 Expression aufweisen, zeigten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (Median von 7.7 Monaten nach Operation) im Vergleich zu Patienten mit p21 exprimierenden Tumoren (Median 13.9 Monate, $p = 0.024$). Die p21 positive Kohorte enthielt auch alle Langzeitüberlebenden.

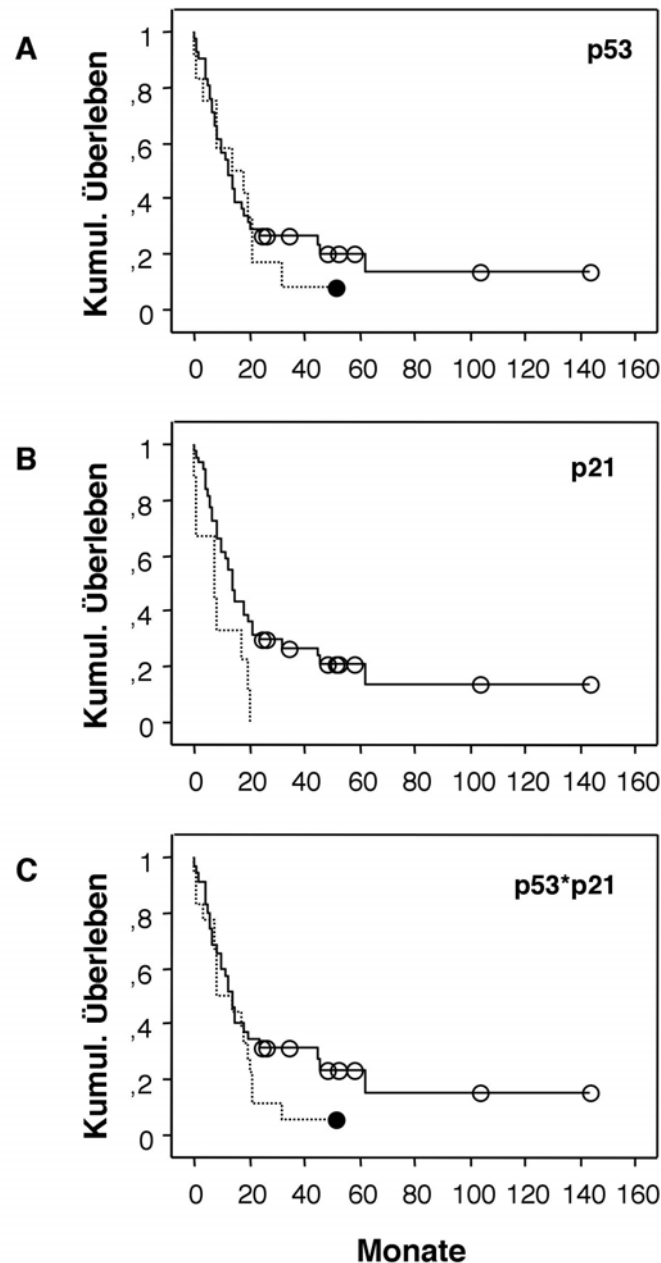


Abb. 16: Kaplan-Meier Überlebensanalyse für p53 Mutation, p21^{CIP/WAF-1} Expression und für den kombinierten p53/p21 Status

A: p53 Wildtyp (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus p53 mutierte Tumore (gestrichelte Linie). P53 Mutationsanalyse wurde mittels SSCP-PCR für Exons 5 bis 8 durchgeführt.

B: p21^{CIP/WAF-1} positive (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus p21^{CIP/WAF-1} negative Tumore (gestrichelte Linie und schwarze Kreise; Cut-off Punkt für p21 Positivität: nukleäre p21 Expression in über 0% der Tumorzellen),

C: p53 Wildtyp/p21 positive Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Tumore mit p53 Mutation oder p21 Expressionsverlust oder beiden Ereignissen (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

Zensierungsereignisse sind mit Kreisen gekennzeichnet.

Die Kombination von p53 Mutation und p21 Expression als p53 Mutation*p21 Expression wurde als Interaktionsvariable berechnet, wobei p53 Wildtyp und p21 Expression mit „1“, d.h. „intakt“, gesetzt wurden (wie zuvor für Rb, Cyclin D1 und p16 beschrieben). Diese kombinierte Signalwegsanalyse konnte allerdings die Unterscheidung zwischen Patienten mit guter bzw. schlechter Prognose nicht verbessern. Patienten mit p53 Wildtyp und hoher p21 Expression zeigten ein medianes Überleben von 13.7 Monaten verglichen mit 8.2 Monaten für Patienten mit Inaktivierung eines oder beider Gene ($p = 0.179$; **Abb. 16C**). Ein ähnlich negatives Ergebnis ergab sich aus der Korrelation von p53 Mutation und Bax Expression (nicht gezeigt), die der Einzelgen-Analyse von Bax nicht überlegen war (nicht gezeigt). Somit ist, im Gegensatz zu p21, p53 Mutation oder Überexpression kein relevanter Faktor zur Prognoseabschätzung von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. P53 Mutation bzw. Überexpression wurden daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

In Analogie zu diesen Analysen wurden Bax und Bcl-2 untersucht. Der Verlust der Bax Expression war signifikant mit einer schlechteren Prognose verbunden. Patienten mit Bax-negativen Tumoren zeigten ein kürzeres medianes Überleben (8.2 Monate) verglichen mit Patienten deren Tumore Bax exprimieren (14.9 Monate, $p = 0.0028$). Alle Langzeit-Überlebenden befanden sich in der Bax-positiven Gruppe (**Abb. 17A**).

Im Gegensatz zu Bax zeigte Bcl-2 Positivität bzw. Fehlen der Bcl-2 Expression keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten (**Abb. 17B**). Patienten mit Bcl-2 negativen Tumoren zeigten ein medianes Überleben von 12.2 Monaten wohingegen das mediane Überleben von Patienten mit Bcl-2 exprimierenden Tumoren bei 14.0 Monaten lag ($p = 0.435$). Bax Positivität und Bcl-2 Negativität, beides Marker für Apoptose-Empfindlichkeit, wurden jeweils mit „1“ kodiert. Allerdings erlaubte die Nutzung der Interaktionsvariablen Bax*Bcl-2 keine Diskriminierung zwischen guter und schlechter Prognose ($p = 0.401$; **Abb. 17C**). Bax positive/Bcl-2 negative Tumore zeigten ein medianes Überleben von 19.3 Monaten während die Patienten der anderen, Bax negativen und/oder Bcl-2 positiven Gruppe ein medianes Überleben von 11.6 Monaten zeigten. Somit konnte durch Einbeziehung von Bcl-2 in die Bax-Analyse keine Verbesserung der prognostischen Aussagekraft im Vergleich zur Einzelgen-Analyse von Bax erreicht werden.

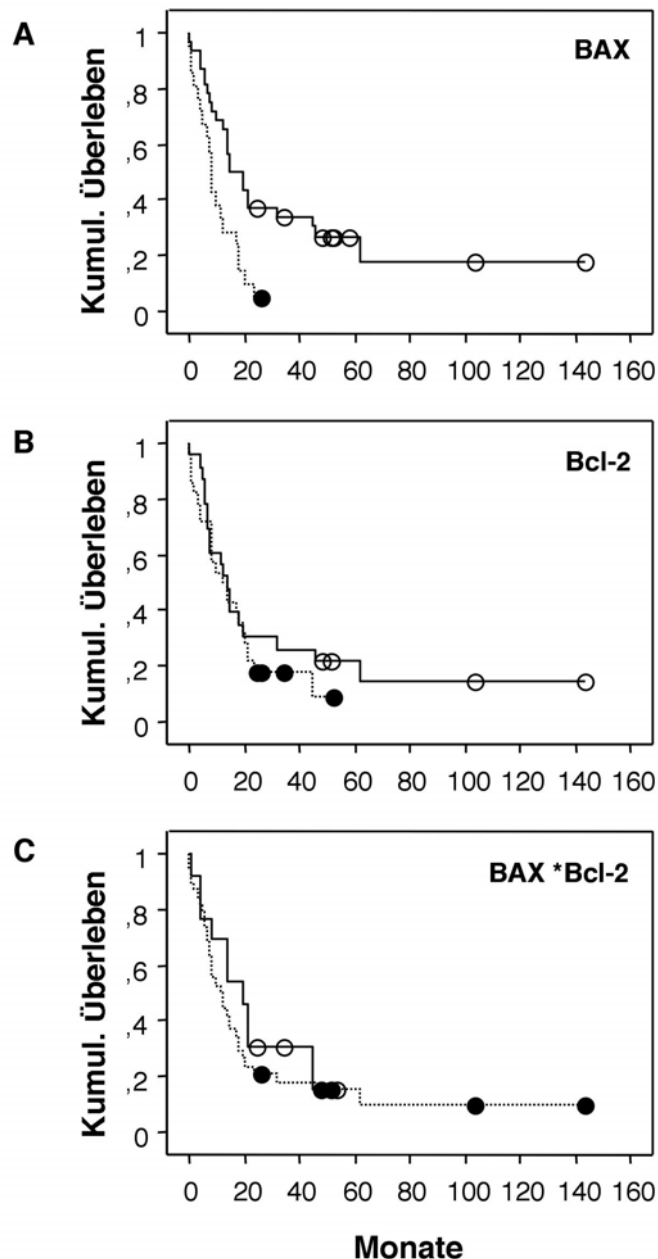


Abb. 17: Kaplan-Meier Überlebensanalyse für Bax und Bcl-2 Expression und für den kombinierten Bax/Bcl-2 Status

A: Bax positive (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Bax negative Tumore (gestrichelte Linie). Der Cut-off Punkt für Bax Positivität wurde bei $\geq 20\%$ positive Tumorzellen gesetzt.

B: Bcl-2 positive (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Bcl-2 negative Tumore (gestrichelte Linie und schwarze Kreise; Cut-off Punkt für Bcl-2 Positivität wurde bei $> 0\%$ positive Tumorzellen gesetzt.

C: Bax positive/Bcl-2 negative Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) versus Tumore mit Bax Verlust, positiver Bcl-2 Expression oder beiden Ereignissen (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

Zensierungsereignisse sind mit Kreisen gekennzeichnet.

Diese Beobachtung deckt sich mit funktionellen experimentellen Daten die zeigen, dass Bax die Apoptose-fördernde Wirkung unabhängig von Bcl-2 (und dessen Homologen) entfalten kann, z.B. bei der Aktivierung der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade. Bcl-2 wurde aufgrund der fehlenden prognostischen Relevanz in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Schließlich wurde hinterfragt, ob die prognostische Aussagekraft von Bax mit den Ergebnissen aus der Analyse des Rb-Signalwegs kombiniert werden kann, um die Identifikation von Patienten mit guter bzw. schlechter Prognose ihrer Tumorerkrankung zu verbessern. Dies machte umso mehr Sinn, als Bax und die Komponenten des Rb-Signalwegs unabhängig voneinander inaktiviert werden (getestet wurde die Interaktionsvariable Cyclin D1*p16*Rb gegen Bax; χ^2 test: $p=0.12$).

Für die Kaplan-Meier Analysen wurden die Patienten mit Hilfe der Interaktionsvariablen Cyclin D1*p16*Bax in Patienten mit niedriger Cyclin D1 Expression, hoher p16 Expression und intakter Bax Expression versus die Patienten mit einer oder mehrerer deregulierter Komponenten (Überexpression von Cyclin D1 und/oder Verlust von p16 und/oder Verlust von Bax) gruppiert.

Kontingenztafel-Analysen zeigten, dass es keine Korrelation zwischen Bax, p16 und Cyclin D1 gab (Fisher's exakter Test: $p = 0.1733$ für Cyclin D1/p16, $p = 0.3184$ für Cyclin D1/Bax und $p = 0.3745$ für Bax/p16; jeweils hoch versus niedrig exprimierende Tumore).

Abbildung 18 zeigt, dass der Einschluss aller drei Faktoren in das Modell die Identifikation einer Patientengruppe ermöglicht, die sich durch eine sehr gute Krankheitsprognose auszeichnet (Cyclin D1^{niedrig}/p16^{hoch}/Bax^{positiv}, $n=10$ von 51 Patienten). Das Gesamtüberleben dieser Patientengruppe erreicht ein Plateau, dass nicht unter das mediane Überleben fällt und alle Langzeitüberlebende enthält. Die Logrank-Analyse der beiden Patientengruppen ergibt einen p-Wert von 0.011 und belegt somit ein deutlich und signifikant besseres Gesamtüberleben der Cyclin D1^{niedrig}/p16^{hoch}/Bax^{positiv} Patientengruppe. Die entsprechenden, mittels Kaplan-Meier Analyse geschätzten 1-, 2- und 5-Jahresüberlebensraten sind in der **Tabelle 8** aufgeführt.

Überraschenderweise konnte durch Einbeziehung von Rb und p21 Expression keine weitere Verbesserung der Identifikation von Patienten mit guter bzw. schlechter Prognose erreicht werden. Alle Patienten in der Cyclin D1^{niedrig}/p16^{hoch}/Bax^{positiv}, also der „intakten“ Gruppe

zeigten in ihren Tumoren auch p21 und Rb Expression oberhalb der Cut-off Werte. Somit war das günstige Cyclin D1^{niedrig}/p16^{hoch}/Bax^{positiv} in allen Fällen mit p21 und Rb Ko-Expression assoziiert. Dies erklärt auch, warum durch Einbeziehung von Rb und p21 in die Cyclin D1^{niedrig}/p16^{hoch}/Bax^{positiv} Gruppe keine Verbesserung der prognostischen Wertigkeit erreicht werden konnte, da beide Gruppen vollständig kongruent sind. Konsequenterweise sind p21 und Rb in diesem Modell auch keine unabhängigen prognostischen Faktoren und wurden in der multivariaten Analyse sowohl durch vorwärts bzw. rückwärts gerichtete Variablenselektion eliminiert (siehe unten).

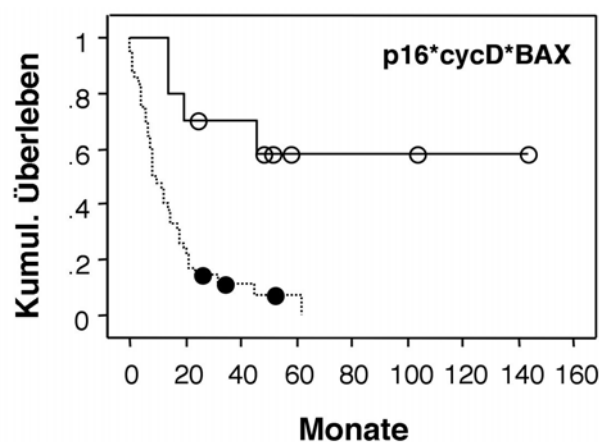


Abb. 18: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus für den kombinierten Cyclin D1/p16^{INK4a}/Bax Status

Zensierte Ereignisse sind mit Kreisen markiert. Cyclin D1 niedrig exprimierende, p16^{INK4a} hoch exprimierende, Bax positive Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore entweder Cyclin D1 überexprimieren und/oder p16^{INK4a} niedrig exprimieren und/oder Verlust der Bax Expression zeigen (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

4.6 Multivariate Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben

Die Analyse der Tumorgrosse (T-Stadium), Lebensalter, Geschlecht und Tumorstadium zeigte in der univariaten Analyse keine prognostische Signifikanz, ist daher nicht gezeigt und wurde deshalb auch nicht im multivariaten Modell analysiert. Unter den „konventionellen“, klinisch-pathologischen Parametern ist insbesondere der N-Status, also das Vorhandensein lokoregionärer Lymphknotenmetastasen, als prognostischer Faktor akzeptiert¹⁸⁴. Die 27

Patienten mit N0-Status zeigten demzufolge ein medianes Überleben von 18.7 Monaten im Gegensatz zu 8.3 Monaten medianem Überleben für die Patienten mit N1-Stadium (Logrank Test: $p = 0.084$). Die univariaten Analysen des N-Status und molekularer Risikofaktoren sind in **Tabelle 9** gezeigt.

Tab. 8: 1-, 2- und 5-Jahres-Gesamtüberleben (geschätzt nach der Kaplan-Meier Methode)

Status *	Anzahl der Patienten *	Gesamtüberleben		
		1-Jahr	2-Jahre	5-Jahre
N-Status N0	27 (50.9%)	66.7%	29.6%	24.7%
N-Status N1	26 (49.1%)	42.3%	19.2%	9.6%
normale Cyclin D1 Expression	9 (17.3%)	62.8%	27.9%	22.0%
Überexpression von Cyclin D1	43 (82.7%)	22.2%	11.1%	0
p16 ^{INK4a} hoch (32.1%)	17 (32.1%)	70.6%	47.1%	33.6%
p16 ^{INK4a} niedrig (67.9%)	36 (67.9%)	47.2%	13.9%	10.4%
Rb hoch	45 (86.5%)	57.8%	28.9%	20.4%
Rb niedrig/negativ	7 (13.5%)	14.3%	0	0
Expression von p21	44 (83%)	59.1%	29.5%	20.9%
p21 niedrig/negativ	9 (17%)	33.3%	0	0
Bax positiv	21 (39.6%)	68.8%	37.5%	26.5%
Bax negativ	32 (60.4%)	33.3%	4.8%	0
Cyclin D1*p16*Rb Interaktion = 1 (intakt)	13 (25.5%)	84.6%	53.8%	44.9%
Cyclin D1*p16*Rb Interaktion =0 (defekt)	38 (74.5%)	44.7%	15.8%	8.4%
Cyclin D1*p16*Bax Interaktion = 1 (intakt)	10 (19.2%)	100%	70.0%	58.3%
Cyclin D1*p16*Bax Interaktion = 0 (defekt)	42 (80.8%)	45.2%	14.3%	7.6%

* Die absolute Anzahl von Patienten mit dem jeweiligen Phänotyp/Genotyp ist im Verhältnis zur Gesamtzahl der Patienten angegeben. Die prozentualen Verhältnisse sind in Klammer angegeben.

** Prozentsatz überlebender Patienten für die jeweilige Subgruppe.

Tab. 9: Univariate Regressionsanalyse, Cox Proportional Hazard Modell.

	Relatives Risiko (RR)	95% Konfidenz- Intervall	p univariat
N-Status (N1)*	1.684	0.927-3.064	0.087
Cyclin D1 Überexpression (>60% pos.)	2.942	1.381-6.270	0.0052
p16 ^{INK4a} niedrig (≤70% pos.)	2.437	1.208-4.916	0.0129
Rb negativ (<20% pos. Zellen)	1.706	0.744-3.914	0.2070
p53 Mutation (Exon 5 to 8)	1.185	0.596-2.359	0.6278
p53 Überexpression (≥20% pos. Zellen)	0.955	0.488-1.867	0.8919
p21 ^{CIP/WAF-1} negativ (0% pos.)	2.322	1.091-4.940	0.0288
Bax negativ (< 20% pos.)	2.547	1.352-4.798	0.0038
Bcl-2 positiv (>0% pos. cells)	1.280	0.688-2.382	0.4364
Interaktion Cyclin D1*p16 ^{INK4a} *Rb	3.477	1.515-7.982	0.0033
Interaktion p53 Mutation*p21	1.523	0.821-2.827	0.1821
Interaktion Bax*Bcl-2	1.356	0.664-2.768	0.4034
Interaktion of Cyclin D1*p16 ^{INK4a} *Bax	5.620	1.958-16.126	0.0013

* *nodal positiv* = N1, d.h. Vorhandensein lokoregionärer Lymphknoten-Metastasen. Für weitere Information zu den dichotomisierten Variablen siehe Material und Methoden.

Diese prognostische Signifikanz für den Nodalstatus war in der multivariaten Analyse kein unabhängiger prognostischer Faktor wenn gleichzeitig die Regulatoren des Rb Signalwegs sowie Bax und deren Interaktionsvariablen analysiert wurden. Die multivariate Analyse mit Vorwärts- der signifikantesten und Rückwärtsselektion der am wenigsten signifikanten Parameter elimierte den N-Status als unabhängigen prognostischen Faktor aus dem Modell. Nur Bax, Cyclin D1 und die Interaktionsvariable Cyclin D1*Bax*p16 verblieben nach der schrittweise vor- und rückwärts durchgeführten Elimination im multivariaten Proportionalen Risiko-Modell nach Cox. In diesem Regressionsmodell betrug das relative Risiko für frühen Tod nach Therapie RR = 3.70, p = 0.0231 für Patienten mit Cyclin D1^{niedrig}/p16^{hoch}/Bax^{positiv} Tumoren, RR = 2.69, p = 0.0157 für Cyclin D1 überexprimierende Tumore und RR = 2.11, p = 0.0344 für Bax^{negative} Tumore (**Tab. 10**).

Tab. 10: Multivariate Regressionsanalyse (Cox Modell)

	Relatives Risiko (RR)	95% Konfidenz-Intervall	p multivariat
Verlust der Bax Expression	2.11	1.056-4.196	0.0344
Cyclin D1 Überexpression	2.69	1.205-6.009	0.0157
Interaktion Cyclin D1*p16 ^{INK4a} *Bax	3.70	1.197-11.457	0.0231

** Variablen wurden nach schrittweiser Vorwärtsselektion und Rückwärtselimination ausgewählt.*

Die einzelnen Parameter p16^{INK4a}, p21^{CIP/WAF-1} verblieben nicht im multivariaten Cox Modell in Folge der überlegenen Wertigkeit der Interaktion zwischen p16^{INK4a}, Cyclin D1 and Bax Expression und wurden durch vorwärts bzw. rückwärts-gerichtete Variablen-Selektion aus dem Modell eliminiert.

4.7 Analyse des späten G1-Restriktionspunkts (Cyclin E und p27^{KIP})

Um die Identifikation von Patienten mit guter bzw. schlechter Prognose weiter zu verbessern, wurden 2 weitere Regulatoren des Rb-Signalwegs in die Analyse einbezogen: der CDK Inhibitor p27^{KIP1} und Cyclin E, der Ko-Aktivator der CDK2 Kinase am späten G1-Restriktionspunkt. Für beide Regulatoren war zuvor in anderen Karzinomentitäten eine prognostische Relevanz gezeigt worden und zwar sowohl für Verlust von p27^{KIP1} 185-187 als auch für Überexpression von Cyclin E 185, 188-192. Für das Ösophaguskarzinom lagen zum Zeitpunkt des Beginns der Analysen noch keine Daten vor. Mittlerweile wurde für beide Regulatoren eine prognostische Relevanz postuliert, jedoch nicht sicher gezeigt.

Expressionsdaten für Cyclin E konnten in 51 der 53 Primärtumore erhoben werden. Der Median der Expression lag bei 30 % positiv angefärbter Zellen (Range 0-95). Für den Färbeindex lag der Median bei 60 (Range 0-285). Für die weiteren Analysen und zur Kategorisierung der Daten in hoch versus niedrig exprimierende Tumore wurde der Median als Cut-off-Punkt gewählt. Sowohl für den Prozentsatz angefärbter Zellen als auch für den

Färbeindex zeigte sich eine 2-phasiger Verteilung mit einer Abgrenzbarkeit der beiden Gipfel am Median.

Die Proteinexpression von nukleärem p27 konnte in allen 53 Primärtumoren untersucht werden und lag im Median bei 5,0 % angefärbter Zellen (Range 0-70). Der Median des Färbeindex lag ebenfalls bei 5,0 (Range 0-210). Für beide Parameter wurde der Median als Cut-off Punkt gewählt.

Die Kombination von p27 und Cyclin E, d.h. die Interaktionsvariable Cyclin E*p27 konnte bei 51 Tumorproben analysiert werden.

Bezüglich der Kaplan-Meier Analysen für das Gesamtüberleben der Patienten wurde für die Überexpression von Cyclin E überhaupt kein Einfluss auf die Prognose der Tumorerkrankung gefunden (Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,985$; **Abb 19B**). Hingegen zeigte der Verlust von p27 einen allerdings nicht signifikanten Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten (Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,129$; **Abb. 19A**). Ebenso zeigte sich für die Kombination von Cyclin E und p27 kein besseres Ergebnis und auch die Interaktionsvariable konnte nicht signifikant zwischen guter und schlechter Prognose diskriminieren (Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,102$; **Abb. 19C**).

Im Hinblick auf die positiven Daten in anderen Tumorentitäten und die teils widersprüchlichen Daten bei Patienten mit Ösophaguskarzinom bestand die Möglichkeit, dass Effekte von Cyclin E bzw. p27 durch Defekte in anderen Rb-Signalwegskomponenten überdeckt werden könnten. Aus diesem Grund wurde der p27- und der Cyclin E-Status mit der Interaktionsvariablen für Rb, Cyclin D1, p16 und p21 in Relation gesetzt. **Abbildung 20** zeigt, dass hohe Expression von p27 sowohl bei Patienten mit intakter Expression von Rb, Cyclin D1, p16 und p21 (**Abb. 20A**; Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,235$) als auch bei Patienten mit einem oder mehreren Defekten in der Expression dieser Gene mit einer guten Prognose assoziiert ist (**Abb. 20B**; Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,106$) ohne allerdings statistische Signifikanz in diesen beiden separaten Analysen zu erreichen. Dennoch ist bemerkenswert, dass die Kombination von intaktem p27 und intakten anderen Rb-Signalwegskomponenten eine Subgruppe von Patienten mit über 70%igem 5-Jahresüberleben identifiziert. Prognostische Signifikanz (Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,001$) erreichte p27 allerdings, wenn es gemeinsam mit der Rb*Cyclin D1*p16*p21 Rb-Signalweg-Interaktionsvariablen zur Stratifikation der Patientengruppen getestet wurde.

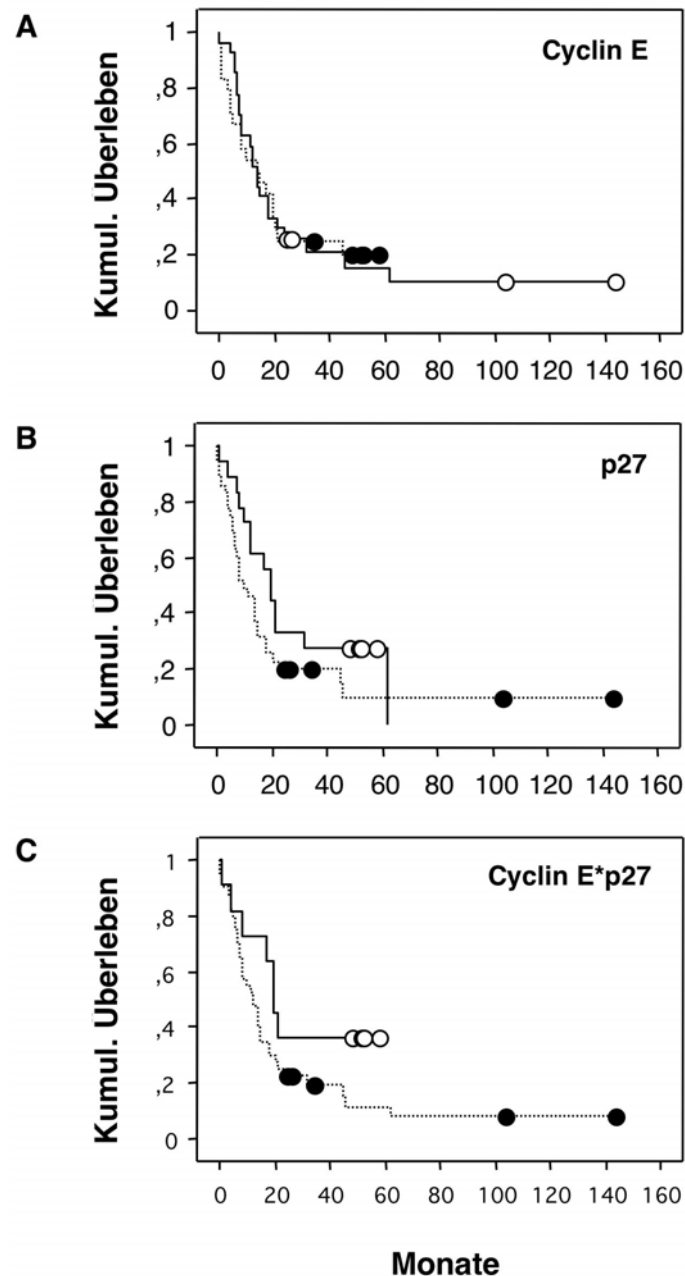


Abb. 19: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus für Expression von $p27^{KIP1}$ und Cyclin E.

Zensierte Ereignisse sind mit Kreisen markiert. (A) P27 hoch (intakt) exprimierende Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore p27 niedrig exprimieren (gestrichelte Linie und schwarze Kreise). (B) Cyclin E niedrig exprimierende Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore Cyclin E hoch exprimieren (gestrichelte Linie und schwarze Kreise). (C) Interaktionsvariable für Cyclin E und p27 wobei niedrige Cyclin E Expression und hohe p27 Expression als „intakt“ definiert wurde (durchgezogene Linie und weisse Kreise). Patienten mit einem oder beiden Defekten wurden in die „defekte“ Kohorte gruppiert (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

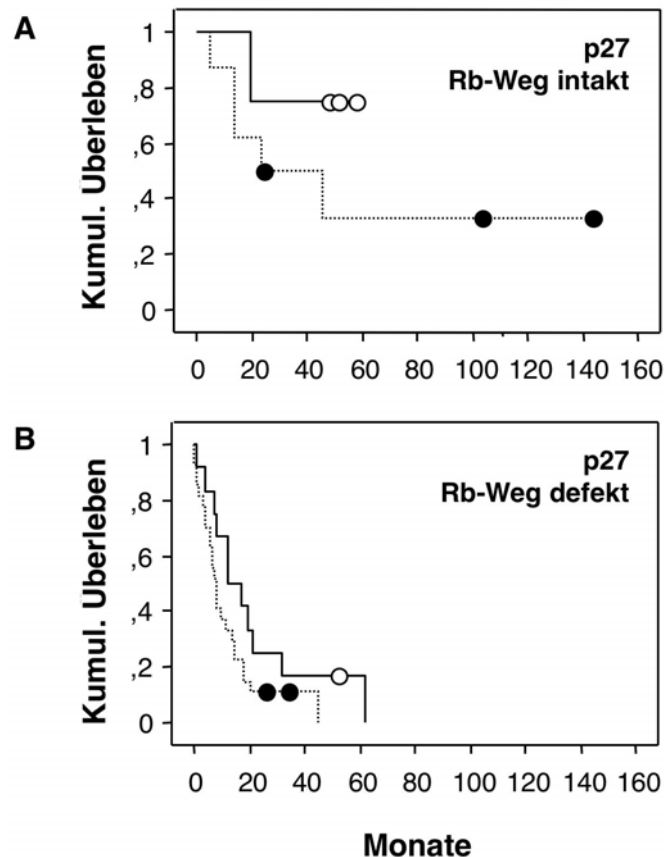


Abb. 20: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus für Expression von p27^{KIP1} in Relation zu zusätzlichen Defekten im Rb-Signalweg

Zensierte Ereignisse sind mit Kreisen markiert. P27 hoch exprimierende Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore p27 niedrig exprimieren (gestrichelte Linie und schwarze Kreise). Verglichen wird der p27 Status mit weiteren Defekten im Rb Signalweg. In (A) wurden Patienten mit intaktem Rb, p16, Cyclin D1, und p21 analysiert. In (B) sind Tumore mit einem oder mehreren Defekten in Rb, p16, Cyclin D1, und p21 analysiert.

Aufgrund der kleinen Fallzahl p27-intakter Patienten in der Rb-Signalwegs-intakten Subgruppe wurde allerdings darauf verzichtet, diesen Parameter in eine neue Interaktionsvariable einzurechnen. Ebenso wurde die kategoriale p27-Expression aufgrund der geringen Fallzahlen und der fehlenden Signifikanz von p27 alleine bezüglich der Krankheitsprognose nicht in die uni- und multivariaten Regressionsanalysen einbezogen. Erwähnenswert ist allerdings noch, dass eine Kontingenztafel-Analyse zeigte, dass es keinen

Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von p27 und der Rb*Cyklin D1*p16*p21 Interaktionsvariablen gibt (χ^2 -Test: $p = 0,867$). Somit kann davon ausgegangen werden, dass p27 unabhängig von den anderen Komponenten des Rb-Signalwegs inaktiviert wird.

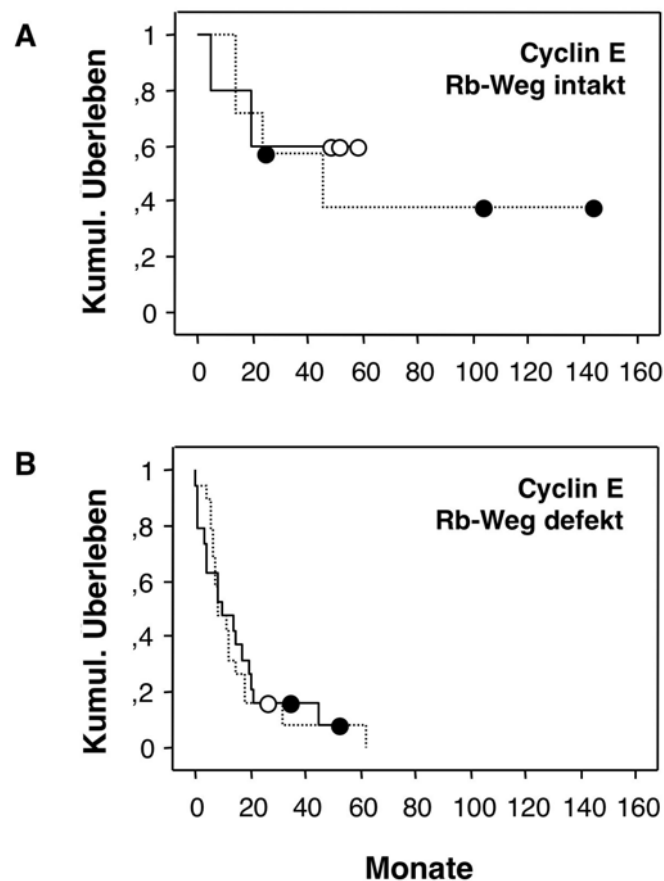


Abb. 21: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus für Expression von Cyclin E in Relation zu zusätzlichen Defekten im Rb-Signalweg

Zensierte Ereignisse sind mit Kreisen markiert. Cyclin E niedrig (intakt) exprimierende Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore Cyclin E hoch exprimieren (gestrichelte Linie und schwarze Kreise). Verglichen wird der Cyclin E Status mit weiteren Defekten im Rb Signalweg. In (A) wurden Patienten mit intaktem Rb, p16, Cyclin D1, und p21 analysiert. In (B) sind Tumore mit einem oder mehreren Defekten in Rb, p16, Cyclin D1, und p21 analysiert.

Analog zu Analyse der p27-Inaktivierung in Relation zum Rb-Signalweg wurde Cyclin E analysiert. Im Einklang mit der fehlenden prognostischen Relevanz bei der Einzelgen-Analyse

von Cyclin E zeigte sich kein Einfluss von p27 bei getrennter Betrachtung der Patienten mit intaktem Rb, Cyclin D1, p16 und p21 (**Abb. 21A**; Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,677$) und bei Patienten, deren Tumore einen oder mehrere Defekte in diesen Signalwegskomponenten tragen (**Abb. 21B**; Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,776$). Hieraus kann gefolgert werden, dass die Überexpression von Cyclin E zwar beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus beobachtet wird und somit möglicherweise pathogenetisch relevant ist, allerdings keinen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung hat.

4.8 Deregulation von Zellzykluskomponenten und Tumorphroliferation

Zusätzlich zur Inaktivierung von Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren wurde die Proliferationsaktivität der Tumore durch immunhistochemischen Nachweis des Ki-67 Antigens analysiert. Das Ki-67 Antigen ist beginnend ab der späten G1-Phase bis in die M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen in G0 und Zellen in der frühen G1-Phase hingegen sind nicht mit Antikörpern gegen Ki-67 anfärbbar. Somit ist die Anfärbbarkeit für Ki-67 ein indirektes Maß für die Anzahl im Zellzyklus voranschreitender Zellen und erlaubt die indirekte Abschätzung der Wachstumsfraktion eines Tumors.

Ki-67 konnte bei 49 der 53 Primärtumore angefärbt werden. Der Median des Prozentsatzes gefärbter Zellen lag bei 12,6 % Ki-67 positive Zellen. Für die kategoriale Datenanalyse wurde daher der Cut-off Punkt von 12,6 % gewählt. Tumore mit Ki-67 Expression über 12,6 % wurden als hoch exprimierende und Tumore kleiner oder gleich 12,6 % positive Zellen als niedrig exprimierende Tumore klassifiziert.

Eine Kaplan-Meier Analyse für das Gesamtüberleben der Patienten zeigte allerdings keinen Einfluss von Ki-67 auf die Krankheitsprognose (**Abb. 22**, Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,897$).

Interessanterweise zeigte sich auch keine signifikante Korrelation von hoher bzw. niedriger kategorialer Ki-67 Expression in Bezug zu einzelnen Zellzyklusregulatoren. Der Vergleich der Expressionsniveaus zeigte bei Ki-67 hoch exprimierenden Tumoren eine gering erniedrigte Expression von Rb, p16, p21, p53, jedoch nicht für Cyclin D1 und E, p27, Bax und Bcl-2 (Mann-Whitney U-Test, sämtliche $p > 0,05$).

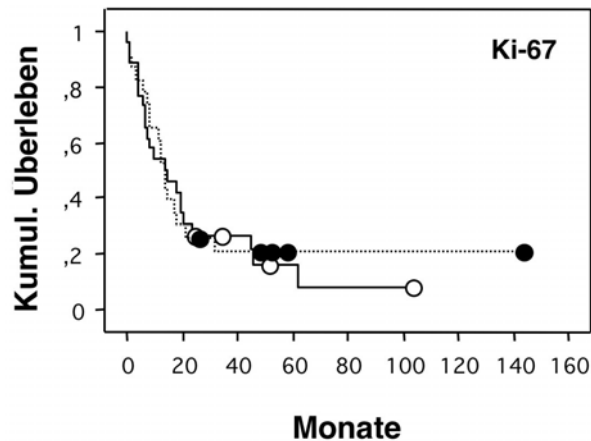


Abb. 22: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus für Expression von Ki-67

Zensierte Ereignisse sind mit Kreisen markiert. Ki-67 niedrig (intakt) exprimierende Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore Ki-67 hoch exprimieren (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

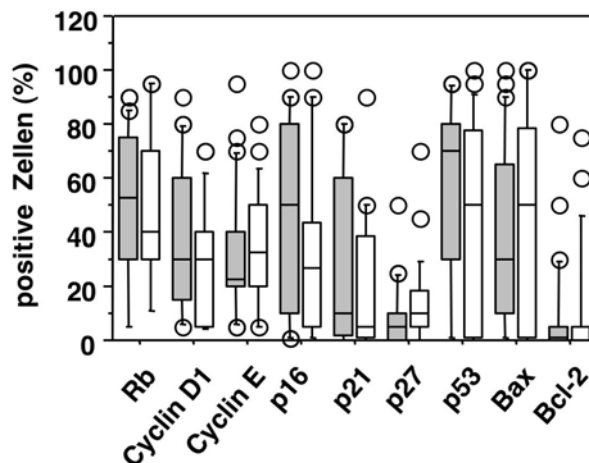


Abb. 23: Immunhistochemisch bestimmte Expressionspiegel von Komponenten des Rb-Signalwegs, Bax und Bcl-2 in Relation zu Ki-67 Expression

Gezeigt sind Box-Grafiken für den prozentualen Anteil positiver Zellen. Graue Boxen: niedrige Ki-67 Expression, weisse Boxen: hohe Ki-67 Expression.

Dies liess vermuten, dass kein einzelner Faktor, sondern die Summe der Störungen des Signalwegs in stark deregulierter Proliferation resultiert. Aus diesem Grund wurden die Ki-67 Expression mit den Interaktionsvariablen Rb*Cyclin D1*p16*p21 und Cyclin E*p27 in Beziehung gesetzt. **Abbildung 24** zeigt den Unterschied im Expressionsniveau von Ki-67 für die Interaktionsvariablen des Rb Signalwegs. Sowohl die kombinierte Störung von Rb, Cyclin D1, p16 und p21, als auch die zusätzliche Inaktivierung von p27 und Cyclin E resultierten in erhöhten Expressionsspiegeln von Ki-67 als Surrogatmarker für Tumorzellproliferation. Hierbei zeigte sich sowohl für Deregulation von Rb*Cyclin D1*p16*p21 als auch für Cyclin E*p27 eine vergleichbare Erhöhung des Prozentsatzes Ki-67-positiver Zellen der auch durch die kombinierte Inaktivierung beider Faktoren nicht weiter anstieg.

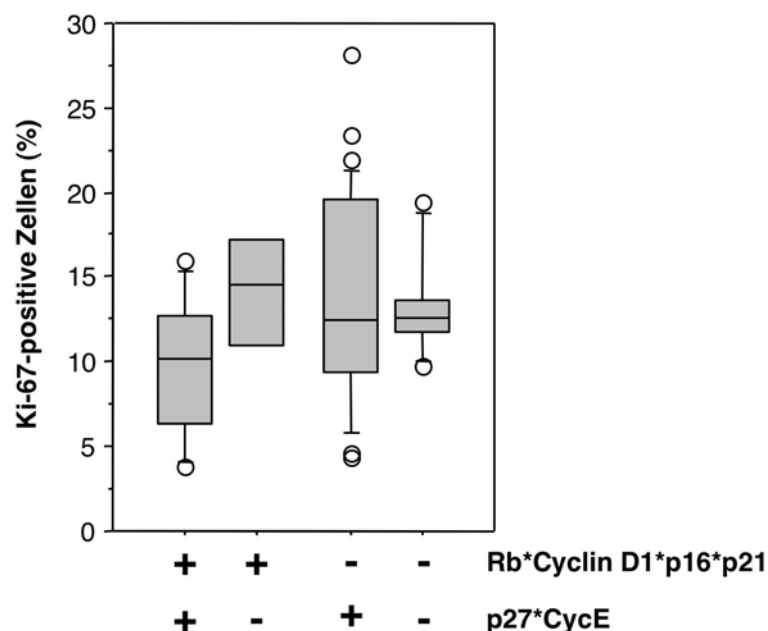


Abb. 24: *Expressionspiegel von Ki-67 in Relation zur Inaktivierung von Komponenten des Rb-Signalweg*

Gezeigt sind Box-Grafiken für den prozentualen Anteil positiver Zellen. Verglichen wurde der Einfluss der kombinierten Störung von Rb, p16 und p21 (Verlust), sowie Cyclin D1 (Überexpression) im Verhältnis zur zusätzlichen kombinierten Inaktivierung (Verlust) von p27 und Cyclin E (Überexpression). +: intakter Signalweg, -: deregulierter Signalweg.

4.9 K-ras Mutation und Inaktivierung von Signalwegen

Aktivierende Punktmutationen von K-ras konnten bei 13 (24,5 %) der 53 Patienten nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten K-ras mutierte Tumore eine höhere Box

Expression, die allerdings keine statistische Relevanz erreichte (Mann-Whitney U-Test: $p = 0,116$, **Abb. 25**). Eine anderweitige Korrelation mit der Expression der analysierten Gene fand sich nicht.

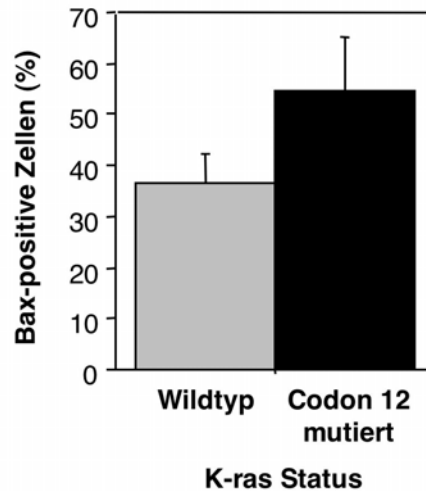


Abb 25: Einfluss von K-ras Mutation auf das Expressionsniveau von Bax

Bax Expression wurde mittels Immunhistochemie quantifiziert. Dargestellt ist der Prozentsatz positiv angefärbter Zellen. K-ras Mutation im Codon 12 wurde mittels eines sequenzspezifischen Festphasenhybridierungstests bestimmt.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigte sich ein schwacher, allerdings nicht signifikanter positiver Einfluss auf das Gesamtüberleben, der mit der höheren Bax-Expression in Verbindung stehen könnte (**Abb. 26**; Log-Rang Mantel-Cox Test: $p = 0,287$).

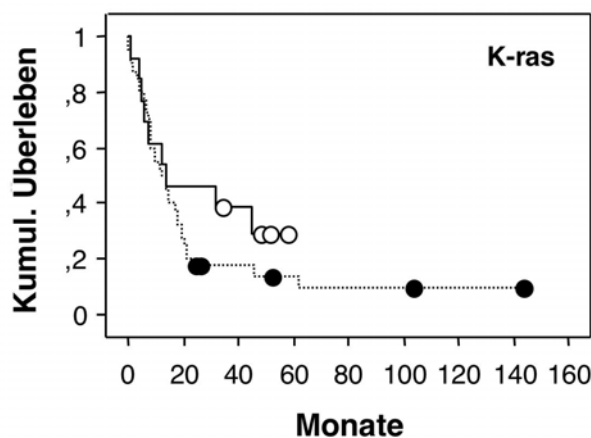


Abb. 26: Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus für Mutation des zellulären K-ras Proto-Onkogens

Zensierte Ereignisse sind mit Kreisen markiert. K-ras-Wildtyp Tumore (durchgezogene Linie und weisse Kreise) werden mit Patienten verglichen, deren Tumore aktivierende Punktmutationen des K-ras Codons 12 tragen (gestrichelte Linie und schwarze Kreise).

Da bisher keine derartigen Effekte von K-ras auf die Krankheitsprognose des Ösophaguskarzinoms bekannt waren und für beide Gene eine sequentielle Inaktivierung im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz postuliert ist, wurde die Relation von K-ras zu p53-Mutation untersucht. Interessanterweise fand sich im vorliegenden Kollektiv keine signifikante Imbalance der Verteilung von p53 und K-ras Mutation. Bei Annahme einer völlig unabhängigen Verteilung beider genetischer Ereignisse errechnet sich eine theoretische Frequenz für kombinierte p53 und K-ras Mutation von 5,5 %; tatsächlich findet sich in 7,6 % eine kombinierte Mutation beider Gene (**Tab. 11**; χ^2 -Test: $p = 0,431$). Dies lässt darauf schliessen, dass K-ras Mutation unabhängig von p53-Mutation auftritt und dass die onkogene Deregulation von K-ras nicht zwingend mit einer Inaktivierung von p53 einhergeht.

Ebenso zeigte sich anhand von Kontingenztafelanalysen kein signifikanter Bezug zur Inaktivierung von Rb-Signalwegs-Inaktivierungen in Relation zur Rb*Cyclin D1*p16*p21 Interaktionsvariablen, so dass Inaktivierung von Rb-Signalwegskomponenten unabhängig von K-ras zu erfolgen scheint. Auch hier sind errechnete Frequenz für Inaktivierung beider Parameter (19,5 %) und tatsächliche Häufigkeit (17,6) für die kombinierte Inaktivierung von K-ras nahezu deckungsgleich (**Tab. 12**; χ^2 -Test: $p = 0,476$).

Tab. 11: Relation von aktivierenden K-ras Mutationen zu p53-Mutation*

Status:	p53 Wildtyp	p53 mutiert	Summe
K-ras Wildtyp	32 (60,4 %)	8 (15,1 %)	40 (75,5 %)
K-ras Codon 12 mutiert	9 (17 %)	4 (7,6 %)	13 (24,5 %)
Summe	41 (77,4 %)	12 (22,6 %)	53 (100 %)

* χ^2 -Test: $p = 0,431$

Tab. 12: Relation von aktivierenden K-ras Mutationen zum Rb-Signalweg

Status:	Rb-Weg intakt	Rb-Weg defekt	Summe
K-ras Wildtyp	8 (15,7 %)	30 (58,8 %)	38 (74,5 %)
K-ras Codon 12 mutiert	4 (7,8 %)	9 (17,6 %)	13 (25,5 %)
Summe	12 (23,5 %)	39 (76,5%)	51 (100 %)

* χ^2 -Test: $p = 0,476$

5. Diskussion

Die Entstehung maligner Tumoren ist ein multifaktorieller Prozess und ist die Folge von Veränderungen verschiedenster zellulärer Regulationsmechanismen die schliesslich zu ungehemmter Proliferation, infiltrativem Wachstum in gesunden Geweben und Metastasierung führen. Der Fortschritt bei der Aufklärung der hieran beteiligten Signalwege zeigte früh, dass die Störung von sowohl Zellzyklus-Regulation als auch Zelltod-Mechanismen, d.h. Apoptose-Programmen, wesentliche Faktoren beim Übergang von normalem zu malignem Zellwachstum darstellen. Ist ein maligner Tumor in Folge derartiger genetischer Veränderungen entstanden, dann können zusätzliche Störungen der Proliferations- und Apoptosekontrolle zur weiteren Enthemmung der Zellproliferation und zunehmender Therapieresistenz führen. Es kommt zur Tumorprogression. Ursächlich hieran beteiligt sind neben den eigentlichen Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren auch Störungen in Signalwegen, die genetische und chromosomale Stabilität kontrollieren, wie z.B. DNA Reparatur und Zellzyklus-Checkpunktkontrolle, aber auch Veränderungen des Tumormikromilieus, z.B. zelluläre Interaktionen mit der Tumorstroma und Veränderungen in der Tumor-Angiogenese.

Der Eintritt ruhender Zellen aus der G0 in die G1-Phase und aus der G1 in die S-Phase wird durch mehrere, konsekutiv wirkende Restriktionspunkte in der G-Phase vermittelt. Hierdurch wird die Progression der proliferierenden Zelle durch die frühe in die späte G1-Phase und der Übertritt in die S-Phase reguliert. Sind diese Checkpunkte inaktiviert, dann ist es der Zelle gestattet in die S-Phase überzugehen und die DNA-Synthese zu beginnen, sowie die spätere M-Phase vorzubereiten. Dieser Vorgang wird engmaschig kontrolliert durch die koordinierte und Phasen-spezifische Expression der G1-Phase Cycline: D1, D2, D3 und E. Diese Kofaktoren werden für die Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) benötigt, wobei D-Cycline mit CDK4 und CDK6, Cyclin E hingegen mit CDK2 interagiert. Die hierdurch aktivierten CDK phosphorylieren das Rb-Protein (bzw. dessen Homologe) in mehreren konsekutiven Schritten und heben hierdurch die Rb-vermittelte Repression von S-Phase-aktivierenden Transkriptionsfaktoren wie E2F und c-myc auf. Die Aktivierung dieser Faktoren in Folge der Inaktivierung von Rb treibt die Zelle in die S-Phase. Aufgrund der zentralen regulatorischen Rolle und der Abhängigkeit der G1-Checkpunktkontrolle von einem intakten Rb-Genprodukt wird dieser die G1/S-Phase Progression vermittelnde Signalweg auch als Rb-Signalweg bezeichnet ⁶⁸.

Im Hinblick auf diese wichtige Rolle bei der Wachstumskontrolle überrascht es nicht, dass Inaktivierungen oder Überaktivität einer oder mehrerer Signalwegskomponenten in praktisch jeder malignen Zelle nachgewiesen werden können. Interessanterweise können sich verschiedene dieser Signalwegsstörungen gegenseitig ausschliessen und treten alternativ auf. Aufgrund dieser Komplexität ist es nahezu unmöglich, die Konsequenzen für Tumorbilogie und klinisches Verhalten von Tumoren abzuschätzen wenn nur einzelne Gene untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war daher, kombinierte Inaktivierungen von Kontrollgenen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zu untersuchen und deren Bedeutung für das klinische Ansprechen zu klären. Im Detail konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines intakten Rb-Signalwegs mit hoher Expression von Rb und p16^{INK4a} gepaart mit niedriger Expression von Cyclin D1 eine Subgruppe von Patienten mit exzellenter Prognose der Tumorerkrankung und gutem Therapieansprechen identifiziert.

Die Identifikation von Patienten mit einer solch guten Prognose kann weiter verbessert werden, wenn Störungen des Rb Signalwegs in Kontext zu Störungen von Zelltodprogrammen gebracht werden. Dies gilt insbesondere für das pro-apoptotische Bax-Protein, dessen Expression in Tumoren durch transkriptionelle Inaktivierung bzw. Mutation des Bax-Gens gestört sein kann.

Die Identifikation von Patienten mit guter Prognose ist von besonderer klinischer Bedeutung in der Therapie des Ösophaguskarzinoms, da die Behandlungsmöglichkeiten und auch deren Erfolg limitiert sind, insbesondere bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen oder gar metastasierten Tumoren. Nach wie vor ist Behandlung der Wahl die chirurgische Entfernung des Tumors. Zusätzliche adjuvante oder neoadjuvante, mehr oder weniger aggressive Radio- oder Radiochemotherapien haben bisher nicht zu einer wesentlichen Verbesserung des Behandlungserfolgs und der generell schlechten Prognose des Ösophaguskarzinoms geführt¹⁸⁴. Dies macht verständlich, warum neue prognostische Marker als klinische Entscheidungshilfe benötigt werden, um die Therapieplanung und klinische Entscheidungsfindung zu erleichtern. So könnten Patienten mit besonders guter Prognose möglicherweise von einer de-eskalierten Therapie profitieren bzw. könnten unnötige Therapien mit geringen Erfolgschancen bei Patienten mit hohem genetischen Risiko vermieden werden. Alternativ könnten Patienten mit ungünstigem genetischen Risikoprofil

und wahrscheinlicher Resistenz für konventionelle Radiochemotherapie neuen Therapiemodalitäten zugeführt werden.

5.1 Molekulare Prognosefaktoren des Ösophaguskarzinoms

Aufgrund der Schwankungsbreite von Therapieansprechen, tumorfreiem und Gesamtüberleben von Patienten mit Ösophaguskarzinom bei Einteilung der Patienten nach konventionellen klinisch-pathologischen Parametern wie z.B. der UICC/TNM- oder der AJCC-Klassifikation, besteht erheblicher Bedarf, die Prognose der Patienten präziser abzuschätzen. Dies gilt insbesondere auch im Hinblick auf den deutlichen Trend zu risikoadaptierten Tumorthérapien und neuen Tumorthérapeutika wie z.B. Tyrosinkinasehemmern. Insbesondere im Hinblick auf den sehr kritisch diskutierten Stellenwert neoadjuvanter und adjuvanter Radio- bzw. Radiochemotherapien ist eine bessere Planbarkeit und Risikoanpassung der meist aggressiven Therapien wünschenswert.

Ein möglicher Weg ist, die zellulären Signalwege zu untersuchen, die an der Tumorentstehung, Tumorprogression und, insbesondere, der Aktivierung und Exekution von Zelltod nach zytotoxischer Tumorthérapie beteiligt sind. Die Störung von Zelltod- und Zellzyklus-Signalwegen trägt nicht nur zur Tumorentstehung bei, sondern ist mit verantwortlich für die Tumorbilogie und den klinischen Verlauf der Erkrankung¹³⁸. Das Entstehen von Tumoren wird hierbei von multifaktoriellen Prozessen bestimmt. Allerdings sind, trotz des zunehmend besseren Verständnisses der generellen molekularen Grundlagen der Tumorgenese, die molekulare Ätiologie des Ösophaguskarzinoms und insbesondere die Mechanismen der Tumorprogression nach wie vor ungeklärt.

Neben ihrer Rolle bei der Tumorphathogenese zeigte sich in einer Vielzahl von Untersuchungen, dass die Inaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene bzw. deregulierte Überaktivität bestimmter Onkogene mit einer besseren oder schlechteren Prognose assoziiert ist. Hierbei ermöglichte insbesondere die Analyse Zellzyklus- und Apoptose-regulierender Signalwege einen neuen Ansatz für die individuelle Risikoabschätzung. Es ist akzeptiert, dass Radiothérapie mit ionisierenden Strahlen und die meisten Chemotherapeutika ihre Wirkung durch Aktivierung von Zellzyklusarrest und/oder Apoptose entfalten. Ebenso ist etabliert, dass maligne Tumoren Störungen in Apoptoseprogrammen aufweisen, die funktionell von zusätzlich nachweisbaren Störungen der Proliferationskontrolle dieser Tumorzellen

abgrenzbar sind. Die Untersuchung von Apoptose-Signalwegen in Kombination mit der Analyse der Zellzyklus-Kontrolle und deren Störungen ist daher ein vielversprechender experimenteller Ansatz zur Identifikation neuer prognostischer und für Therapieansprechen prädiktiver Faktoren in Tumoren.

5.2 Rolle chromosomaler Veränderungen

Eine Vielzahl von Untersuchungen hat chromosomale Veränderungen in Ösophaguskarzinomen und präneoplastischen Geweben identifizieren können. Die Identifikation bevorzugt betroffener chromosomaler Regionen hat hierbei geholfen, Onkogene und Tumorsuppressorgene zu identifizieren, die an der Karzinogenese des Ösophaguskarzinoms beteiligt sind. Regionen mit Amplifikation enthalten mit hoher Wahrscheinlichkeit Onkogene mit erhöhter Aktivität im Tumor. Regionen, die bevorzugt deletiert sind und einen Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) zeigen, enthalten hingegen häufig Tumorsuppressorgene, deren Inaktivierung wichtig für die Tumorgenese ist. Chromosomale Veränderungen bzw. Inaktivierung der Funktion durch Mutation oder Expressionsveränderungen durch epigenetische Ereignisse, wie z.B. Promotormethylierung, und die betroffenen Kandidatengene sind in **Tabelle 13** zusammengefasst.

Durchflusszytometrische Untersuchungen haben zudem konsistent einen hohen Grad an Aneuploidie in Ösophaguskarzinomen gezeigt und zwar sowohl bei Adeno- als auch bei Plattenepithelkarzinomen¹⁹³⁻¹⁹⁶. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass präneoplastische Läsionen mit Aneuploidie mit einem besonders hohen Karzinomrisiko assoziiert sind. Weiterhin ist ausgeprägte Aneuploidie, wie sie durch die relativ grobe DNA-Gehaltsmessung erfasst werden kann, in einigen Studien ein negativer prognostischer Faktor¹⁹⁷⁻²⁰⁰, der allerdings in einigen Studien kein unabhängiger Faktor war. Unklar ist jedoch nach wie vor, wie diese teils massive Aneuploidie entsteht und ob sie generell Ursache oder Folge der Karzinogenese und der deregulierten Proliferation von Tumorzellen ist.

Tab. 13: Lokalisation, Funktion und Pathogenese genetischer Veränderungen beim Ösophaguskarzinom

Chromosom	Gen	Synonym	Funktion	TS	ONC	Art der Veränderung
2p21	MSH2	HMSH2	DNA Mismatch-Reparatur	✓		LOH
3p21	β-Catenin	CTNNB1	Zelluläre Adhäsion, Signaltransduktion		✓	Amplifikation, Mutation
3p21	MLH1	HMLH1	DNA Mismatch-Reparatur	✓		LOH
5q21	APC	FAP Gen	Zelluläre Adhäsion, Signaltransduktion	✓	✓	LOH, Mutation
6p21	p21	WAF1, CIP1, SDI	CDKI, hemmt Zellzyklus-Progression, aktiviert Seneszenz	✓		Methylierung
7p12-13	EGFR	c-erbB1, Her-1	Wachstumsfaktor-Rezeptor, Signaltransduktion		✓	Amplifikation, Induktion
7p22	PDGFα		Wachstumsfaktor-Rezeptor, Signaltransduktion		✓	Induktion
8q24	c-myc		Transkriptionsfaktor, löst S-Phase Progression aus		✓	Amplifikation, Induktion
9p21	p16	INK4a, CDKN2a, MTS1	CDKI, hemmt Zellzyklus-Progression, aktiviert Seneszenz	✓		LOH, Mutation, Methylierung
9p21	p15	INK4b, CDKN2b	CDKI	✓		LOH, Methylierung
11q13	Cyclin D1	CCDN1, PRAD1	Cyclin, Kofaktor für CDK4 und 6		✓	Amplifikation
11q13	FGF	bFGF	Wachstumsfaktor		✓	Induktion
11q13	HBGF	Int2	Wachstumsfaktor		✓	Induktion
12p13	p27	KIP1	CDKI	✓		Methylierung
13q14	Rb	RB1	Zellzyklus-Inhibitor, hemmt Eintritt in die S-Phase	✓		LOH, Mutation, Methylierung
16q22	E-Cadherin	CDH1	Zelluläre Adhäsion, Signaltransduktion	✓	✓	LOH, Mutation
17p13	p53		Hemmt Zellzyklus-Progression, aktiviert Seneszenz und Apoptose	✓		LOH, Mutation
17q21	Her2	Neu, cerbB2, EGFR2	Wachstumsfaktor-Rezeptor, Signaltransduktion		✓	Amplifikation
18q21	DPC4		Signaltransduktion im TGFβ Signalweg	✓		LOH
18q21	Bcl-2		Hemmt Apoptose			Induktion
18q21	DCC		Zelluläre Adhäsion, Signaltransduktion	✓		LOH
19q13	Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein	Vermittelt Apoptose	✓		Methylierung (?)
22q13	PDGFβ	c-sis	Wachstumsfaktor		✓	Induktion

* TS: Tumorsuppressorgen, ONC: Onkogen; einige Mutanten von Tumorsuppressorgen können als Onkogene wirken und Zellproliferation antreiben.

5.3 Marker für Tumorpheriferation und deren prognostische Relevanz

Tumorpheriferation kann direkt über DNA-Gehaltsmessung, Erfassung des mitotischen Index oder indirekt über die Expression proliferationsassoziierter Proteine bestimmt werden. Am gebräuchlichsten hierfür sind das Ki-67/MIB-1 Antigen, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Topoisomerase II α . Während Ki-67 Zellen erfasst, die sich in später G1-Phase, S-, G2- und M-Phase befinden, sind PCNA- und Topoisomerase II α -Expression spezifischer mit der S-Phase-Fraktion assoziiert. Für Plattenepithelkarzinome wurde in mehreren Studien eine negative prognostische Bedeutung für Ki-67 Expression gefunden²⁰¹⁻²⁰³. In diesen Studien konnte aber zumeist keine Unabhängigkeit für Ki-67 Expression als prognostischen Faktor gezeigt werden und Ki-67 Positivität korrelierte teils mit ungünstigen klinisch-pathologischen Faktoren wie hohem T-Stadium oder N1-Stadium oder Auftreten eines Lokalrezidivs^{204, 205}. Hingegen zeigten andere Studien keinen prognostischen Einfluss^{206, 207}.

Für PCNA ergibt sich ein ähnlicher Trend. In einigen Studien wurde hohe PCNA Expression als zumeist abhängiger negativer prognostischer Faktor beschrieben^{208 209 210}. Hingegen zeigt im Vergleich zu Ki-67 eine größere Anzahl von Studien das Fehlen einer prognostischen Signifikanz^{202, 211-213}.

Einige Studien konnten für Ki-67 und PCNA sogar einen prädiktiven Wert für die lokale Tumorkontrolle durch Radiotherapie zeigen: Tumoren mit hoher Expression von Ki-67 bzw. PCNA zeigten eine höhere Wahrscheinlichkeit für komplette Remission nach alleiniger Radiotherapie²¹⁴ und eine geringere Rate an Lokalrezidiven nach definitiver Bestrahlung²⁰⁵. Dies zeigt indirekt, dass Tumore mit einem hohen Anteil an proliferierenden Zellen empfindlicher auf DNA-Schädigung reagieren im Vergleich zu Tumoren mit geringem Proliferationsanteil.

Für Topoisomerase II α konnte eine deutliche Überexpression in Ösophaguskarzinomen gezeigt werden²¹⁵. Insgesamt liegen jedoch deutlich weniger publizierte Ergebnisse vor als für Ki-67 und PCNA. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Topoisomerase II α Expression ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen von Plattenepithelkarzinomen auf Polychemotherapie ist²¹⁶. Interessanterweise korrelierten weder der Anteil Ki-67 positiver noch TUNEL-positiver, d.h. apoptotischer Zellen als Mass für die Fähigkeit zur Spontanapoptose, mit der therapeutischen Antwort dieser Tumore.

In präneoplastischen Läsionen konnte, ebenso wie im Fall der Aneuploidie, sowohl für starke Anfärbbarkeit der Gewebe mit Antikörpern gegen Ki-67 als auch für PCNA, also erhöhte Proliferation, ein erhöhtes Risiko für maligne Transformation gezeigt werden²¹⁷.

5.4 Inaktivierung des Rb-Signalwegs und prognostische Bedeutung

Als Ursache für die deregulierte Proliferationskontrolle findet sich in jedem Tumor eine funktionelle oder genetische Inaktivierung von Komponenten des Rb-Signalwegs. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass die Inaktivierung des RB1 Gens ein häufiges Ereignis in malignen Tumoren ist. Die biallelische Inaktivierung von Rb ist mit hoher Penetranz mit kindlichen Retinoblastomen assoziiert⁹⁵.

Beim Ösophaguskarzinom wurde Verlust der Heterozygotie im RB1 Genlokus, also Deletion eines der beiden RB1 Allele, in 48 bis zu 67% der Patienten mit Plattenepithelkarzinom beschrieben²¹⁸⁻²²¹. Hingegen ist die Rolle von Rb Mutationen nur schlecht definiert, wahrscheinlich im Hinblick auf die komplexe Struktur und die Größe des RB1 Genlokus.

Eine andere Studie zeigte Verlust des Rb-Proteins in 24% der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus. Allerdings konnte, wie in der gegenwärtigen Untersuchung, kein Bezug zur Proliferations-Aktivität der Tumore etabliert werden²²². Ein anderer Bericht zeigte hohe Rb Proteinexpression bei 161 von 172 Fällen wobei nur 11 Karzinome negativ waren. In dieser Studie konnte der isolierte Verlust der Rb Expression, anlog zu den hier erhobenen Daten, nicht mit einem signifikant schlechterem Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden²²³.

Für Cyclin D1 wurde zuvor bei Vorliegen einer Überexpression des Proteins ein negativer Effekt auf die Prognose beschrieben¹⁷⁹. Wie auch bei anderen Tumoren mit Überexpression von Cyclin D1 kann dies, wie für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gezeigt wurde, durch Genamplifikation des für Cyclin D1 kodierenden CCND1 Genlokus erfolgen²²⁴. Cyclin D1 Überexpression ist direkt mit der Proliferationsaktivität ösophagealer Plattenepithelkarzinome assoziiert, wie die Expression von PCNA, eines indirekten Markers für Proliferation, zeigte^{204, 222}. Dies legt nahe, dass Deregulation von Cyclin D1 eine der treibenden Kräfte der Proliferation in diesen Tumoren ist. Neben der Bedeutung für die Tumorphysik wurde auch die Bedeutung der Cyclin D1 Expression für das

Therapieansprechen untersucht. In einigen Studien konnte Überexpression von Cyclin D1 als negativer prognostischer Faktor etabliert werden ^{141, 179, 225-231} während andere Studien keine prognostische Relevanz fanden ^{203, 232}. Patienten mit CCND1 Genamplifikation zeigten ebenfalls eine schlechtere Prognose ¹⁴¹. Bei 34 Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie zeigte sich zudem eine Reduktion der Größe des Primärtumors um 75,3% in der Cyclin D1-negativen und um 42,7% in der Cyclin D1-positiven Gruppe ($p = 0,0025$) ²³³, so dass Cyclin D1-Überexpression als prädiktiver Faktor für Ansprechen auf Radiochemotherapie dienen könnte.

Eine vergleichbare Störung des G1-Restriktionspunkts kann in humanen Tumoren durch Inaktivierung des p16^{INK4a} Gens entstehen ¹⁷⁹. Inaktivierung von p16 kann auf verschiedenen Ebenen entstehen, und zwar durch homozygote Inaktivierung beider INK4a Genloci, heterozygote Inaktivierung eines Locus und Inaktivierung des zweiten Locus durch Methylierung, Punktmutation, Deletion in Exon 1 oder 2 mit resultierenden aberranten Proteinen oder Abschaltung durch epigenetische Mechanismen, insbesondere Hypermethylierung von CpG Inseln im p16 Promotor oder Inaktivierung beider Allele über letztgenannte Mechanismen. Die Mehrzahl dieser genetischen oder epigenetischen Veränderungen führt zu verringerter oder komplettem Verlust der p16^{INK4a} Proteinexpression ²³⁴. Aus tumortherapeutischer Sicht ist zudem von Interesse, dass humane Tumorzellen mit fehlender p16 Aktivität resistent gegenüber DNA-Schädigungs-induziertem Wachstumsarrest sind im Vergleich zu Zellen mit intakter p16 und Rb Expression und Funktion ²³⁵.

In der gegenwärtigen Analyse ist gezeigt, dass Patienten mit intakter Rb und p16^{INK4a} Expression und gleichzeitig fehlender Cyclin D1 Überexpression eine deutlich bessere Prognose zeigten als die Patienten, bei denen ein oder mehrere Defekte in diesen Genen nachweisbar waren. Dies ist im Einklang mit den oben beschriebenen publizierten Daten zu Einzelgenanalysen. Allerdings zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Multi- gegenüber der Einzelgenanalyse. Der Grund hierfür liegt sicherlich in der Tatsache begründet, dass Inaktivierungen von Komponenten des Rb-Signalwegs häufig alternativ sind und bei Betrachtung nur eines Gens nicht sicher zwischen Tumoren mit bzw. ohne Inaktivierung des Rb-Signalwegs und entsprechend deregulierter Wachstumskontrolle des Tumors unterschieden werden kann.

5.5 Störung des späten G1-Restriktionspunkts

Neben der Inaktivierung des frühen G1-Restriktionspunkts spielt die Störung des späten G1 Restriktionspunkts eine wesentliche Rolle in der Tumorphagenese und -biologie. Überexpression von Cyclin E ist ausreichend, um S-Phaseprogression auszulösen. Cyclin E/CDK2 Komplexe werden wiederum durch den CDK Inhibitor p27^{KIP1} gehemmt. Für den Verlust der p27 Proteinexpression konnte in publizierten Studien gezeigt werden, dass diese Störung mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist^{209, 236-239}. Ein solcher Einfluss auf die Krankheitsprognose konnte jedoch nicht für erhöhte Proteinexpression von Cyclin E gezeigt werden^{229, 231, 240}. Ebenso zeigten andere Studien keine prognostische Relevanz für das Niveau der p27 Expression^{230, 241}.

Insgesamt war die Datenlage zu p27, vor allem aber für Cyclin E, unklar bezüglich der prognostischen Bedeutung. Aus diesem Grund wurden beide Schlüsselkomponenten in die Analyse des Rb-Signalwegs einbezogen. Wie diese Analysen in der vorliegenden Arbeit zeigen, ist der Verlust von p27 von grenzwertig signifikanter Bedeutung für die Prognose. Patienten mit hoher Expression des p27 Proteins zeigten eine etwas bessere Prognose als Patienten mit p27 Verlust. Interessanterweise war dieser Effekt unabhängig vom Rb/Cyclin D1/p16/p21 Status. Ebenso zeigte eine Kontingenztafelanalyse, dass Verlust von p27 und Inaktivierung der anderen untersuchten Rb-Signalwegskomponenten unabhängig voneinander auftreten. Durch Einbeziehung von p27 ist somit eine Verbesserung der Prognoseabschätzung möglich. Hingegen zeigte sich kein Einfluss von Cyclin E auf die Prognose und zwar weder bei Betrachtung von Cyclin E alleine bzw. im Kontext mit der Inaktivierung anderer Rb-Signalwegskomponenten. Der Grund hierfür ist unklar, insbesondere im Hinblick auf die positiven Daten zu Cyclin E als prognostischen Faktor in anderen Tumorentitäten. Allerdings kann aufgrund der vorliegenden Daten im Einklang mit publizierten Studien geschlossen werden, dass Cyclin E keine treibende Kraft in der Tumorprogression des Ösophaguskarzinoms darstellt.

Diese Interpretation wird gestützt durch die Analysen zum Zusammenhang zwischen Inaktivierung von Rb-Signalwegskomponenten im Verhältnis zur Ki-67 Expression als Surrogatmarker für Tumorzellproliferation. Hier zeigte sich wie erwartet, dass die Tumorzellproliferation in Folge der Deregulation von Rb/Cyclin D1/p16/p21 erhöht war, die zusätzliche Inaktivierung von p27 und Cyclin E aber keine weitere Steigerung bewirkte.

5.6 Prognostische Bedeutung der Inaktivierung von Komponenten des p53-Signalwegs

Um die Identifikation von Patienten mit günstigem oder ungünstigem Risikoprofil, d.h. Langzeitüberleben oder frühem Tod nach Therapie ihres Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus weiter zu verbessern, wurden Komponenten des p53 Signalwegs in die Analyse einbezogen, und zwar p53 und die beiden p53-Effektoren p21^{CIP/WAF-1} und Bax. P53 wird als Effektormolekül verschiedener Stress-Signalwege aktiviert und wirkt über die Aktivierung von Inhibitoren des Zellzyklus wachstumshemmend bzw. kann Apoptose induzieren, z.B. durch Stimulation der Bax-Proteinexpression.

Das p53 Protein ist ein transkriptioneller Aktivator bzw. Repressor einer Vielzahl und, mit Entwicklung neuer genomweiter Detektionsmethoden, ständig zunehmender Anzahl von Genen die an der Regulation von Zellzyklus und Apoptose beteiligt sind (Übersicht in ^{70, 121}). Mutationen des p53 Gens werden in bis zu 50% der Fälle in verschiedenen Tumoren inklusive des Ösophaguskarzinoms gefunden ^{242, 243}. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl von Untersuchungen zur Bedeutung des p53 Status und dessen Bezug zu Prognose oder Antwort auf Tumorthherapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus durchgeführt. Das Ergebnis dieser monogenetischen Untersuchungen war allerdings enttäuschend. Initial wurde in einer Reihe von Untersuchungen ermutigende Ergebnisse publiziert, die p53 Inaktivierung durch Mutation oder Überexpression des p53 Proteins als negativen prognostischen Faktor zeigten ^{203, 244-249}. Allerdings fand sich eine solche Assoziation von p53 Mutation und schlechter Prognose in einer Reihe weiterer, zumeist neuerer Untersuchungen nicht, so dass p53 nicht der entscheidende die Tumorbilogie und Prognose zu bestimmende Faktor beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu sein scheint ^{204, 250-252}.

Mutiertes p53 Protein hat häufig die Fähigkeit verloren, an p53-Erkennungssequenzen in p53-regulierten Promotoren zu binden ²⁵³. Dies kann zu einem Defekt in der Expression von Zielgenen wie z.B. Bax führen. Zusätzlich kann die direkte Inaktivierung von weiter downstream im Signalweg gelegenen p53-Effektoren die Fähigkeit von p53 Zellzyklus-Arrest oder Apoptose auszulösen aufheben ^{70, 174, 254, 255}. Aus diesem Grund wurden die p53-Effektoren Bax und p21^{CIP/WAF-1} in die Analyse einbezogen.

Bax ist ein Aktivator des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs und kann direkt die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien auslösen. Cytochrom c bildet zusammen mit dATP bzw. ATP und dem zytosolischen Protein APAF-1 und der Procaspase-9 das mitochondriale Apoptosom. Die Bindung von Cytochrom c und (d)ATP an APAF-1 löst eine Konformationsänderung in APAF-1 aus, wodurch die Bindung von Procaspase-9 in das Apoptosom ausgelöst wird. Hierdurch wird die autokatalytische Spaltung und Prozessierung der Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9 begünstigt und die Caspase-Kaskade zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6, und 7 initiiert. Bax ist nicht nur ein zentraler Effektor der Apoptose sondern spielt auch eine zentrale Rolle in der Hemmung der Onkogen-induzierten Tumorgenese über den p53-Signalweg ²⁵⁶. Weiterhin ist Bax ein Schlüsselfaktor in der Vermittlung der p53-abhängigen und -unabhängigen Apoptose nach Chemotherapie-induzierter DNA-Schädigung ²⁵⁷.

Wildtyp p53 ist ein transkriptioneller Aktivator des Bax Gens ²⁵⁸ und Überexpression von Wildtyp p53 erhöht die Expression des Bax Proteins ²⁵⁹. Im Gegensatz hierzu führt die Inaktivierung von p53 nicht zwangsläufig zum Verlust der Bax Expression, da zusätzliche Faktoren an der Regulation der Aktivität des Bax Gens und der Bax Proteinexpression beteiligt zu sein scheinen ^{174, 181}. Gleiches gilt für p21^{CIP/WAF-1} und dies vermag die fehlende Korrelation zwischen p53 Status und Expressionsniveau von Bax und p21^{CIP/WAF-1} Protein beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu erklären ¹³⁸.

Im Gegensatz zu p53 war die Inaktivierung beider p53 Effektorgene, d.h. sowohl von Bax als auch von p21^{CIP/WAF-1} bei den jeweiligen Einzelgenanalysen mit einer schlechteren Prognose der Patienten korreliert. Wesentlich interessanter für die gegenwärtige Analyse war aber, dass die Inaktivierung von Bax unabhängig von der Inaktivierung der Komponenten des Rb Signalwegs Rb, p16 und Cyclin D1 war. Aus diesem Grund erlaubte die Kombination der Parameter Bax, Cyclin D1 und p16^{INK4a} und, in eingeschränktem Umfang, von p21^{CIP/WAF-1} und Rb selbst, eine bessere Diskriminierung zwischen Patienten mit schlechter Prognose und hohem Risiko für frühen Tod nach Therapie und den Patienten mit guter Prognose und Langzeitüberleben in der aktuellen multifaktoriellen Analyse.

Schliesslich wurde gezeigt, dass die relativ niedrige Expression und die geringfügigen Expressionsunterschiede von Bcl-2 nicht relevant für die Krankheitsprognose sind. Dies ist von Interesse, da in einer Vielzahl von Veröffentlichungen das Expressionsverhältnis von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie z.B. Bcl-x_L oder Bcl-2 selbst in Relation

zu den pro-apoptotischen Mitgliedern wie z.B. Bax als entscheidend für die Apoptose-Empfindlichkeit und das Resistenzverhalten bei Chemo- oder Radiotherapie dargestellt wird. Neuere Ergebnisse hingegen zeigen, dass Bax, unabhängig von Bcl-2, Apoptose über den mitochondrialen Signalweg aktivieren kann indem es direkt und unabhängig von Bcl-2 die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien auslöst ¹⁶¹. In diesem Zusammenhang zeigten Untersuchungen bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie, dass Verlust von Bax, jedoch nicht Veränderungen in der Bcl-2 Expression mit dem Wiederauftreten der Erkrankung und einem Defekt in der Aktivierung der Caspase-Signalkaskade assoziiert ist ¹⁸². Zusätzlich bestimmt das Expressionsniveau von Bax, jedoch nicht des Bcl-2 Proteins, die Empfindlichkeit für Chemotherapie-induzierte Apoptose bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie ¹⁸¹. Gleichermassen zeigte sich keine prognostische Relevanz der Bcl-x_L Expression in einer grossen Serie von 172 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ²⁶⁰. Dies bestätigt den Befund der vorliegenden Untersuchung und in anderen Tumorentitäten, dass Bax von grösserer Bedeutung für die Resistenz gegen Tumorthherapie und für schlechte Prognose im Vergleich zu Bcl-2 oder Bcl-x_L zu sein scheint ^{181, 182}.

5.7 Inaktivierung von Kontrollgenen und Mechanismus der Karzinogenese

Neben dieser Bedeutung für die Prognose deutet die offensichtliche Unabhängigkeit dieser genetischen Ereignisse auf unterschiedliche Mechanismen der Karzinogenese und Tumorprogression hin. Solche genetischen Ereignisse und Kombinationen von Inaktivierungen spezifischer Signalwegskomponenten können wiederum die Basis für die Entwicklung spezifischer klinisch-pathologischer Merkmale sein wie im vorliegenden Fall Grading und Nodalstatus. In der vorliegenden Studie zeigte sich eine klar Assoziation zwischen p21^{CIP/WAF-1} Verlust und Vorliegen lokoregionärer Lymphknotenmetastasen, d.h. N1-Status und konsequenterweise einem schlechteren Gesamtüberleben. Hingegen zeigten alle weiteren Korrelationen zwischen p21 Expressionsniveau mit klinisch-pathologischen Parametern ein negatives Ergebnis. Die Ursache hierfür könnte in der Tatsache liegen, dass die Mehrzahl dieser Ereignisse multifaktoriell bestimmt sind und daher, wie auch die Prognose der Tumorerkrankung, mit spezifischen genetischen Risikoprofilen korreliert und, weniger wahrscheinlich, mit Inaktivierung einzelner Gene. Hierfür spricht auch, dass nur durch Analyse von Kombinationen von Zellzyklusregulatoren des Rb-Signalwegs ein Einfluss auf die Wachstumsfraktion der Tumorzellen gefunden wurde.

5.8 Onkogene Transformation und Inaktivierung von Signalwegen

Auch bezüglich der Tumorphathogenese konnten in der vorliegenden Untersuchung teils überraschende Ergebnisse herausgearbeitet werden. Unstrittig ist, dass aktivierende Mutationen von K-ras eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation gastrointestinaler Tumoren spielen. Für das K-ras Onkogen konnte in tierexperimentellen Systemen klar gezeigt werden, dass die onkogene Transformation obligat mit einer Inaktivierung des p14^{ARF}/p53 Signalwegs einhergeht. Die alleinige Überaktivität zellulärer Onkogene wie K-ras oder c-myc löst in den betroffenen Zellen programmierten Zelltod oder Seneszenz aus und schützt hierdurch den Organismus vor ungehemmter und deregulierter Proliferation genetisch geschädigter Zellen in denen es zur Deregulation von Onkogenen gekommen ist.

Überraschend war daher, dass K-ras Mutation nicht mit einer erhöhten Rate von p53 Mutation einherging. Bezüglich der Bax Expression zeigte sich sogar eine erhöhte Bax-Expression bei den K-ras mutierten Tumoren. Ebenso war K-ras Mutation unabhängig von p53-Mutationen. Gleichfalls bestand kein Zusammenhang zwischen K-ras Mutation und Inaktivierung von Komponenten des Rb-Signalwegs, d.h. Verlust von Rb, p16, p21, p27, p53 Proteinexpression bzw. Überexpression von Cyclin D1 oder Cyclin E.

Der Grund für diese scheinbar paradoxen Befunde könnte in der Biologie der durch K-ras aktivierten Signalwege liegen. Neben der Stimulation der Proliferation durch Aktivierung der MAP-Kinasekaskade, Aktivierung von fos/jun Transkriptionsfaktoren und hieraus resultierender Durchbrechung des G1-Restriktionspunkts vermittelt K-ras über die Aktivierung der PI3-Kinase und der nachgeschalteten PKB/Akt Kinase Schutz vor Apoptose. Somit haben K-ras mutierte Tumore weniger Bedarf, den Rb-Signalweg oder den p14^{ARF}/p53/Bax Signalweg durch genetische Ereignisse wie Mutation, Deletion oder globale Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters zu inaktivieren. Dies könnte auch die andeutungsweise bessere Prognose der K-ras mutierten Tumore in dieser Studie erklären.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass eine Multigen- oder „Multimarker“-Analyse von Genen, die konsekutiv oder synergistisch in Zellzyklus- und Apoptose-Signalwegen agieren zur Prognoseabschätzung der Analyse individueller Gene deutlich überlegen ist^{174, 255}. Die Identifikation solcher genetischer Markerprofile sollte sich auch zukünftig als nützlich für die klinische Entscheidungsfindung in der Therapie maligner

Tumore erweisen und wird konventionelle klinische pathologische Faktoren komplementieren, die bisher keine ausreichende Prognoseabschätzung erlauben.

Ziel sich nun anschliessender Untersuchungen ist daher, die Untersuchung der hier als prognostisch relevant identifizierten Rb-Signalwegskomponenten und Apoptosekontrollgene um zusätzliche Parameter zu erweitern, um die Aussagekraft weiter zu verbessern, und den prädiktiven Wert in kontrollierten, prospektiven Studien zur zytotoxischen adjuvanten bzw. palliativen Chemo- und Radiochemotherapie von Patienten mit Ösophaguskarzinom zu validieren und zu spezifizieren.

6. Zusammenfassung

Störung des G1-Restriktionspunkts des Zellzyklus und Verlust der Wachstumskontrolle in Folge der Inaktivierung des Rb-Signalwegs ist ein häufiges Ereignis in malignen Tumoren. Gemeinsam mit der Hemmung von Apoptose-Signalwegen sind solche genetischen Ereignisse zentrale pathogenetische Faktoren der Tumorentstehung. Diese Veränderungen prägen aber auch entscheidend die Tumorbilogie und bestimmen somit intrinsische und erworbene Therapieresistenz und konsequenterweise auch die klinische Prognose der Tumorerkrankung. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen im Rb- und im p53-Signalweg in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus untersucht. Diese retrospektive Studie wurde an Tumorproben von 53 mit kurativer Intention R0-resezierten Patienten durchgeführt. Proteinexpression wurde mittels Immunhistochemie und Mutationen mittels SSCP-PCR analysiert. Aktivierende Punktmutationen des K-ras Onkogens wurden mittels mutationsselektiver genomischer PCR und eines sequenzspezifischen Festphasen-Hybridisierungstests nachgewiesen. Die Analyse der individuellen Gene zeigte, dass Expressionsverlust der Rb-Signalwegskomponenten p16^{INK4a}, p21^{CIP/WAF-1}, p27^{KIP1} und von Rb selbst, sowie die Überexpression von Cyclin D1 bzw. Verlust des pro-apoptotischen Bcl-2 Homologs Bax mit schlechter Prognose, d.h. kürzerem Überleben korrelierte. Überexpression von Cyclin E, p53 oder Bcl-2, sowie Mutation von p53 bzw. K-ras zeigten hingegen keinen Einfluss auf die Prognose. Das längste Überleben wurde in einer Subgruppe von Patienten beobachtet deren Tumore eine Kombination günstiger Genotypen zeigte, und zwar niedrige Cyclin D1 Expression, sowie hohe Expression von Rb, p21^{CIP/WAF-1}, p16^{INK4a} und Bax. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Multigen- oder „Multimarker“-Analyse von Genen, die konsekutiv oder synergistisch in Zellzyklus- und Apoptose-Signalwegen agieren, zur Prognoseabschätzung der Analyse individueller Gene deutlich überlegen ist. Die Identifikation solcher genetischer Markerprofile sollte sich auch zukünftig als nützlich für die klinische Entscheidungsfindung in der Therapie maligner Tumore erweisen und wird konventionelle klinische und pathologische Faktoren komplementieren, die bisher keine ausreichende Prognoseabschätzung erlauben.

7. Literatur

1. Geh JI. The use of chemoradiotherapy in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:300-13.
2. Fink U, Stein HJ, Wilke H, Roder JD, Siewert JR. Multimodal treatment for squamous cell esophageal cancer. *World J Surg* 1995;19:198-204.
3. Roth JA. Molecular surgery for cancer. *Arch Surg* 1992;127:1298-302.
4. Desoubreux N, Le Prieur A, Launoy G, Maurel J, Lefevre H, Guillois JM, Gignoux M. Recent time trends in cancer of the oesophagus and gastric cardia in the region of Calvados in France, 1978-1995: a population based study. *Eur J Cancer Prev* 1999;8:479-86.
5. Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001;30:1415-25.
6. Kodama M, Kodama T. The interference of geographical changes of cancer risk in tumor etiology in Japan. *Anticancer Res* 1993;13:1035-42.
7. Smith EM. Japanese cohort mortality from cancers of the upper digestive and respiratory tracts. *Int J Epidemiol* 1984;13:148-54.
8. Muir CS, McKinney PA. Cancer of the oesophagus: a global overview. *Eur J Cancer Prev* 1992;1:259-64.
9. Chen WS, Chen SR, Lin QH, Qiu JW, Xie XK, Fu LN, Li WM, Liao DD, Chen JH, Wu ZR, et al. Epidemiologic investigation of carcinoma of the esophagus and gastric cardia carcinoma in Nanao County, Guangdong province. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1986;8:265-7.
10. Li JY. Epidemiology of esophageal cancer in China. *Natl Cancer Inst Monogr* 1982;62:113-20.
11. Gao C. The mortality of patients with malignant tumors in eleven cities of Jiangsu Province, 1984-1986. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1991;12:158-62.
12. Ke L. Mortality and incidence trends from esophagus cancer in selected geographic areas of China circa 1970-90. *Int J Cancer* 2002;102:271-4.

13. Ghavamzadeh A, Moussavi A, Jahani M, Rastegarpanah M, Iravani M. Esophageal cancer in Iran. *Semin Oncol* 2001;28:153-7.
14. Saidi F, Sepehr A, Fahimi S, Farahvash MJ, Salehian P, Esmailzadeh A, Keshoofy M, Pirmoazen N, Yazdanbod M, Roshan MK. Oesophageal cancer among the Turkomans of northeast Iran. *Br J Cancer* 2000;83:1249-54.
15. Ghadirian P. Food habits of the people of the Caspian Littoral of Iran in relation to esophageal cancer. *Nutr Cancer* 1987;9:147-57.
16. Ghadirian P. Thermal irritation and esophageal cancer in northern Iran. *Cancer* 1987;60:1909-14.
17. Ahsan H, Neugut AI, Gammon MD. Association of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus with tobacco-related and other malignancies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:779-82.
18. Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Lowenfels AB. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. *J Epidemiol Community Health* 1996;50:636-9.
19. Suzuk L, Noffsinger AE, Hui YZ, Fenoglio-Preiser CM. Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1996;78:704-10.
20. Ziegler RG. Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology. *Cancer* 1986;58:1942-8.
21. Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky JS. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. *Cancer Detect Prev* 1988;11:225-34.
22. Ghadirian P, Ekoe JM, Thouez JP. Food habits and esophageal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 1992;16:163-8.
23. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994;21:403-10.
24. Terry P, Lagergren J, Wolk A, Nyren O. Drinking hot beverages is not associated with risk of oesophageal cancers in a Western population. *Br J Cancer* 2001;84:120-1.
25. Mayne ST, Navarro SA. Diet, obesity and reflux in the etiology of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in humans. *J Nutr* 2002;132:3467S-70S.
26. Shaheen N, Ransohoff DF. Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002;287:1972-81.

27. Chen X, Yang CS. Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogenesis* 2001;22:1119-29.
28. Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:85-92.
29. Lagergren J, Bergstrom R, Adami HO, Nyren O. Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 2000;133:165-75.
30. Suleiman UL, Harrison M, Britton A, McPherson K, Bates T. H2-receptor antagonists may increase the risk of cardio-oesophageal adenocarcinoma: a case-control study. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:185-91.
31. Syrjanen KJ. Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas. *Arch Geschwulstforsch* 1982;52:283-92.
32. Shen ZY, Hu SP, Lu LC, Tang CZ, Kuang ZS, Zhong SP, Zeng Y. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma. *J Med Virol* 2002;68:412-6.
33. Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:721-8.
34. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Cintorino M, Santopietro R, Tosi P, Syrjanen K. Human papillomavirus involvement in esophageal carcinogenesis in the high-incidence area of China. A study of 700 cases by screening and type-specific in situ hybridization. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:123-30.
35. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Ji HX, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. *Int J Cancer* 1990;45:21-5.
36. Daly JM, Fry WA, Little AG, Winchester DP, McKee RF, Stewart AK, Fremgen AM. Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study. *J Am Coll Surg* 2000;190:562-72.
37. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998;83:2049-53.
38. Daly JM, Karnell LH, Menck HR. National Cancer Data Base report on esophageal carcinoma. *Cancer* 1996;78:1820-8.

39. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993;104:510-3.
40. Blot WJ, McLaughlin JK. The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol* 1999;26:2-8.
41. Wijnhoven BP, Louwman MW, Tilanus HW, Coebergh JW. Increased incidence of adenocarcinomas at the gastro-oesophageal junction in Dutch males since the 1990s. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:115-22.
42. Blaser MJ, Saito D. Trends in reported adenocarcinomas of the oesophagus and gastric cardia in Japan. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:107-13.
43. Bollschweiler E, Holscher AH. Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany. *Onkologie* 2001;24:180-4.
44. Walther C, Zilling T, Perfekt R, Moller T. Increasing prevalence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastro-oesophageal junction: a study of the Swedish population between 1970 and 1997. *Eur J Surg* 2001;167:748-57.
45. Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van Den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* 2000;29:645-54.
46. Bytzer P, Christensen PB, Damkier P, Vinding K, Seersholm N. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999;94:86-91.
47. Lord RV, Law MG, Ward RL, Giles GG, Thomas RJ, Thursfield V. Rising incidence of oesophageal adenocarcinoma in men in Australia. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:356-62.
48. Hansen S, Wiig JN, Giercksky KE, Tretli S. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. *Int J Cancer* 1997;71:340-4.
49. Liabeuf A, Faivre J. Time trends in oesophageal cancer incidence in Cote d'Or (France), 1976-93. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:24-30.
50. Thomas RJ, Lade S, Giles GG, Thursfield V. Incidence trends in oesophageal and proximal gastric carcinoma in Victoria. *Aust N Z J Surg* 1996;66:271-5.

51. Launoy G, Faivre J, Pienkowski P, Milan C, Gignoux M, Pottier D. Changing pattern of oesophageal cancer incidence in France. *Int J Epidemiol* 1994;23:246-51.
52. Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Increasing incidence of both major histological types of esophageal carcinomas among men in Sweden. *Int J Cancer* 1993;54:402-7.
53. Johnston BJ, Reed PI. Changing pattern of oesophageal cancer in a general hospital in the UK. *Eur J Cancer Prev* 1991;1:23-5.
54. Lee RG, Compton CC. Protocol for the examination of specimens removed from patients with esophageal carcinoma. A basis for checklists. The Cancer Committee, College of American Pathologists, and the Task Force on the Examination of Specimens From Patients With Esophageal Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:925-9.
55. Roder JD, Busch R, Stein HJ, Fink U, Siewert JR. Ratio of invaded to removed lymph nodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg* 1994;81:410-3.
56. Stahl M, Wilke H, Fink U, Stuschke M, Walz MK, Siewert JR, Molls M, Fett W, Makoski HB, Breuer N, Schmidt U, Niebel W, Sack H, Eigler FW, Seeber S. Combined preoperative chemotherapy and radiotherapy in patients with locally advanced esophageal cancer. Interim analysis of a phase II trial. *J Clin Oncol* 1996;14:829-37.
57. Holscher AH, Bollschweiler E, Bumm R, Bartels H, Hofler H, Siewert JR. Prognostic factors of resected adenocarcinoma of the esophagus. *Surgery* 1995;118:845-55.
58. Holscher AH, Bollschweiler E, Schneider PM, Siewert JR. Prognosis of early esophageal cancer. Comparison between adeno- and squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;76:178-86.
59. Senninger N. Esophageal carcinoma. Staging and necessary preoperative diagnosis. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:281-3.
60. Markowitz A, Gerdes H. Diagnosis and preoperative staging of esophageal cancer. *Atlas of Clinical Oncology: Cancer of the upper gastrointestinal tract* 2002;1:23-46.
61. Ellis FH, Jr., Watkins E, Jr., Krasna MJ, Heatley GJ, Balogh K. Staging of carcinoma of the esophagus and cardia: a comparison of different staging criteria. *J Surg Oncol* 1993;52:231-5.

62. Fleming I, Cooper J, Henson D. AJCC cancer staging manual. *American Joint Committee on Cancer* 1997;5th Edition, Lippincott-Raven.
63. Deutsche Krebsgesellschaft. Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002.
64. Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. *Ann Surg* 2001;234:360-7.
65. Mariette C, Fabre S, Balon JM, Finzi L, Triboulet JP. Factors predictive of complete resection of operable esophageal cancer: review of 746 patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:454-62.
66. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
67. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407:796-801.
68. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-8.
69. Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1994;6:279-89.
70. Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000;14:2035-44.
71. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79-88.
72. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-2.
73. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097-9.
74. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991;352:345-7.

75. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 1991;6:2363-9.
76. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 1999;284:156-9.
77. Wyllie AH, Bellamy CO, Bubb VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, Harrison DJ, Hooper ML, Toft N, Webb S, Bird CC. Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer* 1999;80:34-7.
78. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991;349:254-6.
79. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1062-74.
80. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366-74.
81. Stern B, Nurse P. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* 1996;12:345-50.
82. Kuntzel H, Schulz A, Ehbrecht IM. Cell cycle control and initiation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 1996;377:481-7.
83. Moser BA, Russell P. Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:631-6.
84. Hunt T. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 1991;2:213-22.
85. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:295-312.
86. Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Miloloza A, Hengstschlager-Ottstad E. Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res* 1999;436:1-9.
87. Li A, Blow JJ. The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 2001;3:E182-4.
88. Funk JO. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 1999;19:4772-80.

89. Gillett CE, Barnes DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 1998;51:310-6.
90. Donjerkovic D, Scott DW. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res* 2000;10:1-16.
91. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-12.
92. Classon M, Dyson N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 2001;264:135-47.
93. Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000;247:1-15.
94. Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW. Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* 2000;5:D121-37.
95. Kaelin WG, Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 1999;21:950-8.
96. Kastan MM, Giordano A. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 1998;5:132-40.
97. Grana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 1998;17:3365-83.
98. Johnson DG, Schneider-Broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci* 1998;3:d447-8.
99. Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 1998;3:d887-912.
100. Suzuki R, Kuroda H, Komatsu H, Hosokawa Y, Kagami Y, Ogura M, Nakamura S, Kidera Y, Morishima Y, Ueda R, Seto M. Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia* 1999;13:1335-42.
101. Keyomarsi K, Herliczek TW. The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res* 1997;3:171-91.
102. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999;18:5311-7.
103. Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res* 1999;248:339-49.

104. Adams PD, Kaelin WG, Jr. The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;208:79-93.
105. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992;69:119-28.
106. Bergeron L, Yuan J. Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:55-63.
107. Cory S, Vaux DL, Strasser A, Harris AW, Adams JM. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 1999;59:1685s-92s.
108. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996;381:713-6.
109. Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med* 1997;3:313-9.
110. Kadowaki Y, Fujiwara T, Fukazawa T, Shao J, Yasuda T, Itoshima T, Kagawa S, Hudson LG, Roth JA, Tanaka N. Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21^{sdi1} gene transfer. *Clin Cancer Res* 1999;5:4233-41.
111. Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin- dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997;57:5441-5.
112. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:94-9.
113. Serrano M. The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:865-9.
114. Hay TJ, Meek DW. Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett* 2000;478:183-6.
115. Honda R, Yasuda H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* 1999;18:22-7.

116. Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, Sherr CJ, Zambetti GP. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 2000;14:2358-65.
117. Groth A, Weber JD, Willumsen BM, Sherr CJ, Roussel MF. Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D- dependent kinases. *J Biol Chem* 2000;275:27473-80.
118. Hemmati PG, Gillissen B, von Haefen C, Wendt J, Stärck L, Güner D, Dörken B, Daniel PT. Adenovirus-mediated overexpression of p14ARF induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* 2001;im Druck.
119. Lowe SW. Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 1995;7:547-53.
120. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001;20:1803-15.
121. Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* 2001;20:3449-55.
122. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela I, Kaminski N, Getz G, Domany E, Givol D. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 2001;20:2225-34.
123. Nakano K, Wousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001;7:683-94.
124. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-8.
125. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, Jr. p73 is a simian p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389:191-4.
126. Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 1998;4:839-43.
127. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene

- related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-19.
128. Yamaguchi H, Inokuchi K, Sakuma Y, Dan K. Mutation of the p51/p63 gene is associated with blastic crisis in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2001;15:1729-34.
 129. Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Laurenzi VD, Huegli B, Kreuzer KA, Schmidt CA, Melino G, Fey MF, Tobler A, Cajot JF. Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:62-5.
 130. Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:605-15.
 131. Moll UM, Erster S, Zaika A. p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta* 2001;1552:47-59.
 132. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-9.
 133. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998;282:1497-501.
 134. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999;401:616-20.
 135. Griffiths SD, Clarke AR, Healy LE, Ross G, Ford AM, Hooper ML, Wyllie AH, Greaves M. Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene* 1997;14:523-31.
 136. Schmitt CA, McCurrach ME, de Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 1999;13:2670-7.
 137. Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT. Analysis of the p53/Bax pathway in colorectal cancer: low Bax is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* 1999;17:1364-74.

138. Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, Wolff G, Hauptmann S, Dörken B, Daniel PT. Analysis of p53/Bax/p16ink4a/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: High Bax and p16ink4a/CDKN2 identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19:2272-81.
139. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999;18:3004-16.
140. Inomata M, Uchino S, Tanimura H, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Amplification and overexpression of cyclin D1 in aggressive human esophageal cancer. *Oncol Rep* 1998;5:171-6.
141. Shinozaki H, Ozawa S, Ando N, Tsuruta H, Terada M, Ueda M, Kitajima M. Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information. *Clin Cancer Res* 1996;2:1155-61.
142. Siebert R, Willers CP, Opalka B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996;23:505-20.
143. Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:2977-84.
144. Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ. Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Oncogene* 1996;13:1867-73.
145. Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002;89:824-37.
146. Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK. Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 2001;413:311-6.
147. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-95.
148. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.

149. Daniel PT, Sturm I, Wieder T, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001;15:1022-32.
150. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-42.
151. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 1995;14:5579-88.
152. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 1999;283:543-6.
153. Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol* 1999;9:R381-4.
154. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
155. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
156. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
157. Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 1995;374:731-3.
158. Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12401-6.
159. Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000;473:27-32.
160. Bosanquet, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ, Dörken B, Daniel PT. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin,

- cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1035-44.
161. Jürgensmeier JM, Xie ZH, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95:4997-5002.
 162. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-32.
 163. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:63-7.
 164. Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 2000;275:12321-5.
 165. Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000;19:4309-18.
 166. Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 2000;7:1174-81.
 167. Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C, Jacotot E, Belzacq AS, Brenner C, Kroemer G. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 2000;7:1146-54.
 168. Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Nunez G. Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem* 2000;275:8461-8.
 169. Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1998;273:33489-94.
 170. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998;1:949-57.
 171. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R,

- Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
172. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
 173. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* 1999;18:2040-8.
 174. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Lück H-J, Wolff G, Dörken B, Daniel PT. Impaired Bax protein expression in breast cancer: mutational analysis of the Bax and the p53 gene. *Int J Cancer* 2000;87:517-21.
 175. Weyrer K, Feichtinger H, Haun M, Weiss G, Ofner D, Weger AR, Umlauft F, Grunewald K. p53, Ki-ras, and DNA ploidy in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Lab Invest* 1996;74:279-89.
 176. Berndt C, Haubold K, Wenger F, Brux B, Muller J, Bendzko P, Hillebrand T, Kottgen E, Zanow J. K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases. *Clin Chem* 1998;44:2103-7.
 177. Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 1991;6:1079-83.
 178. Berndt C, Wolf G, Schroder G, Bebenroth M, Oehlschlegel K, Hillebrand T, Zanow J. A microplate assay for K-ras genotyping. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:837-40.
 179. Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Shih CH, Koyanagi K, Ueda M, Kitajima M. Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 1997;3:2229-36.
 180. Schelwies K, Sturm I, Grabowski P, Scherübl H, Schindler I, Hermann S, Stein H, Buhr HJ, Riecken EO, Zeitz M, Dörken B, Daniel PT. Analysis of p53/Bax in primary colorectal carcinoma: low Bax protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer* 2002;99:589-96.

181. Bosanquet, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ, Dörken B, Daniel PT. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:1035-44.
182. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Eßmann F, Seeger K, Wuchter C, Ludwig W-D, Henze G, Dörken B, Daniel PT. Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2- ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 2000;14:1606-13.
183. Mrozek A, Petrowsky H, Sturm I, Krauss J, Hermann S, Hauptmann S, Lorenz M, Daniel P. Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma with low microsatellite instability. *Cell Death Differ* 2002;10:461-67.
184. Roth J, Putnam JB, Rich TA, Forastiere AA. Cancer of the esophagus. In: Hellmann S, ed. *Cancer. Principles and Practice of Oncology*, ed. 5th Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publishers, 1997:980-1021.
185. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997;3:222-5.
186. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997;3:227-30.
187. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997;3:231-4.
188. Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:242-4.
189. Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Tanabe G, Baba M, Kuroshima K, Aikou T. The cooperative role of p27 with cyclin E in the prognosis of advanced gastric carcinoma. *Cancer* 2000;89:1214-9.

190. Donnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R. Cyclin E immunoexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications. *Hum Pathol* 2001;32:89-94.
191. Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y. Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:945-53.
192. Kim HK, Park IA, Heo DS, Noh DY, Choe KJ, Bang YJ, Kim NK. Cyclin E overexpression as an independent risk factor of visceral relapse in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:464-71.
193. Kaketani K, Saito T, Kobayashi M. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in esophageal cancer. Aneuploidy as an index for highly malignant potential. *Cancer* 1989;64:887-91.
194. McKinley MJ, Budman DR, Grueneberg D, Bronzo RL, Weissman GS, Kahn E. DNA content in Barrett's esophagus and esophageal malignancy. *Am J Gastroenterol* 1987;82:1012-5.
195. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987;93:1-11.
196. Edwards JM, Jones DJ, Wilkes SJ, Hillier VF, Hasleton PS. Ploidy as a prognostic indicator in oesophageal squamous carcinoma and its relationship to various histological criteria. *J Pathol* 1989;159:35-41.
197. Yasunaga M, Tabira Y, Imaoka S, Kitamura N. Prognostic value of mitotic metaphase rate in oesophageal cancer. *Eur J Surg* 2000;166:616-21.
198. Doki Y, Shiozaki H, Tahara H, Kobayashi K, Miyata M, Oka H, Iihara K, Mori T. Prognostic value of DNA ploidy in squamous cell carcinoma of esophagus. Analyzed with improved flow cytometric measurement. *Cancer* 1993;72:1813-8.
199. Nakamura T, Nekarda H, Hoelscher AH, Bollschweiler E, Harbeck N, Becker K, Siewert JR, Harbec N. Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexpression in adenocarcinoma of Barrett's esophagus. *Cancer* 1994;73:1785-94.

200. Chanvitan A, Nekarda H, Casson AG. Prognostic value of DNA index, S-phase fraction and p53 protein accumulation after surgical resection of esophageal squamous-cell carcinomas in Thailand. *Int J Cancer* 1995;63:381-6.
201. Youssef EM, Matsuda T, Takada N, Osugi H, Higashino M, Kinoshita H, Watanabe T, Katsura Y, Wanibuchi H, Fukushima S. Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1995;76:358-66.
202. Lam KY, Law SY, So MK, Fok M, Ma LT, Wong J. Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1996;77:7-13.
203. Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;86:1396-405.
204. Shimada Y, Imamura M, Watanabe G, Uchida S, Harada H, Makino T, Kano M. Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 1999;80:1281-8.
205. Okuno Y, Nishimura Y, Kashu I, Ono K, Hiraoka M. Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 for radiotherapy of oesophageal squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999;80:387-95.
206. Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, Dutkowski P, Torzewski M, Willers R, Gabbert HE. The prognostic significance of tumour cell proliferation in squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Br J Cancer* 1996;74:1012-6.
207. Sakurai K, Hata S, Amano S, Fukuzawa M. Immunohistochemical study of p16MTS1/INK4a and Ki-67 expression in esophageal squamous cell carcinomas. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:8-13.
208. Dabrowski A, Szumilo J, Brajerski G, Wallner G. Proliferating nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor of squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 2001;56:59-67.
209. Yasunaga M, Tabira Y, Kondo K, Okuma T, Kitamura N. The prognostic significance of cell cycle markers in esophageal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Dis Esophagus* 1999;12:120-7.

210. Kinugasa S, Tachibana M, Hishikawa Y, Abe S, Yoshimura H, Monden N, Dhar DK, Nagasue N. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:405-10.
211. Goukon Y, Sasano H, Nishihira T, Nagura H, Mori S. p53 overexpression in human esophageal carcinoma: a correlation with tumor DNA ploidy and two parameter flow cytometric study. *Anticancer Res* 1994;14:1305-12.
212. Shiozaki H, Doki Y, Kawanishi K, Shamma A, Yano M, Inoue M, Monden M. Clinical application of malignancy potential grading as a prognostic factor of human esophageal cancers. *Surgery* 2000;127:552-61.
213. Wang LS, Chow KC, Chi KH, Liu CC, Li WY, Chiu JH, Huang MH. Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma: analysis of clinicopathological and biological factors. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1933-40.
214. Sugahara S, Ohara K, Takahashi A, Irie T, Watanabe T, Tanaka N, Nozawa K, Nakajima K, Itai Y. Prognostic significance of the PC10 index for patients with stage II and III oesophageal cancer treated with radiotherapy. *Acta Oncol* 1999;38:1057-62.
215. Ohashi Y, Sasano H, Yamaki H, Shizawa S, Kikuchi A, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H. Topoisomerase II alpha expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:1873-80.
216. Rees M, Stahl M, Klump B, Willers R, Gabbert HE, Sarbia M. The prognostic significance of proliferative activity, apoptosis and expression of DNA topoisomerase II alpha in multimodally-treated oesophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:3637-42.
217. Illueca C, Llombart-Bosch A, Ferrando Cucarella J. Prognostic factors in Barrett's esophagus: an immunohistochemical and morphometric study of 120 cases. *Rev Esp Enferm Dig* 2000;92:726-37.
218. Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Sridhara R, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992;52:6525-30.
219. Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srivastava S, McDaniel T, Boynton RF, Zou ZQ. Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rb in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:1889-94.

220. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Ishida K, Saito K, Satodate R. Aberrations of tumor-suppressor genes (p53, apc, mcc and Rb) in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;57:21-5.
221. Morgan RJ, Newcomb PV, Bailey M, Hardwick RH, Alderson D. Loss of heterozygosity at microsatellite marker sites for tumour suppressor genes in oesophageal adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1998;24:34-7.
222. Shamma A, Doki Y, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Yano M, Kimura Y, Yamamoto M, Monden M. Effect of cyclin D1 and associated proteins on proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 1998;13:455-60.
223. zur Hausen A, Sarbia M, Heep H, Willers R, Gabbert HE. Retinoblastoma-protein (pRb) expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 1999;84:618-22.
224. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69:225-35.
225. Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:832-41.
226. Toyoda H, Nakamura T, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S, Ohashi K, Seto M, Shiku H, Nakamura S. Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Dig Dis Sci* 2000;45:864-9.
227. Naitoh H, Shibata J, Kawaguchi A, Kodama M, Hattori T. Overexpression and localization of cyclin D1 mRNA and antigen in esophageal cancer. *Am J Pathol* 1995;146:1161-9.
228. Nagasawa S, Onda M, Sasajima K, Makino H, Yamashita K, Takubo K, Miyashita M. Cyclin D1 overexpression as a prognostic factor in patients with esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;78:208-14.
229. Matsumoto M, Furihata M, Ohtsuki Y, Sasaguri S, Ogoshi S. Immunohistochemical characterization of p57KIP2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:1947-52.

230. Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27(Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. *Oncology* 1999;57:311-7.
231. Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:439-43.
232. Shimada Y, Watanabe G, Yamasaki S, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi JI, Itami A, Fukumoto M, Kanda Y, Imamura M. Histological response of cisplatin predicts patients' survival in oesophageal cancer and p53 protein accumulation in pretreatment biopsy is associated with cisplatin sensitivity. *Eur J Cancer* 2000;36:987-93.
233. Samejima R, Kitajima Y, Yunotani S, Miyazaki K. Cyclin D1 is a possible predictor of sensitivity to chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:5515-21.
234. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3.
235. Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, Rollins BJ. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998;18:378-87.
236. Ohashi Y, Sasano H, Yamaki H, Shizawa S, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H. Cell cycle inhibitory protein p27 in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:1843-8.
237. Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27(KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-8.
238. Sakurai K, Hata S, Amano S, Kimura T, Hori A, Sakamoto A, Kimizuka K, Mimatsu K, Nishio S, Miyake H, Shibata M, Fukuzawa M. Immunohistochemical study of p53, p27 and PCNA expression in esophageal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1998;25:1269-72.
239. Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-64.

240. Matsumoto M, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:256-61.
241. Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T. Significance of the expression of p27Kip1 in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* 2000;13:179-84.
242. Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, Montesano R, Harris CC. Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9958-61.
243. Hollstein MC, Peri L, Mandard AM, Welsh JA, Montesano R, Metcalf RA, Bak M, Harris CC. Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res* 1991;51:4102-6.
244. Shimoyama S, Konishi T, Kawahara M, Aoki F, Harada N, Shimizu S, Murakami T, Kaminishi M. Expression and alteration of p53 and p21(waf1/cip1) influence the sensitivity of chemoradiation therapy for esophageal cancer. *Hepato Gastroenterology* 1998;45:1497-504.
245. Ribeiro UJ, Finkelstein SD, Safatle RA, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998;83:7-18.
246. Pomp J, Davelaar J, Blom J, van KC, Zwinderman A, Quint W, Immerzeel J. Radiotherapy for oesophagus carcinoma: the impact of p53 on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1998;46:179-84.
247. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR, Patel YV, Shah NG, Ghosh N, Suthar TP, Balar DB. Clinical significance of p53, nm23, and Bcl-2 in T3-4N1M0 oesophageal carcinoma: an immunohistochemical approach. *J Surg Oncol* 1997;65:111-6.
248. Uchino S, Saito T, Inomata M, Osawa N, Chikuba K, Etoh K, Kobayashi M. Prognostic significance of the p53 mutation in esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:287-92.
249. Shimaya K, Shiozaki H, Inoue M, Tahara H, Monden T, Shimano T, Mori T. Significance of p53 expression as a prognostic factor in oesophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;422:271-6.

250. Lam KY, Tsao SW, Zhang D, Law S, He D, Ma L, Wong J. Prevalence and predictive value of p53 mutation in patients with oesophageal squamous cell carcinomas: a prospective clinico-pathological study and survival analysis of 70 patients. *Int J Cancer* 1997;74:212-9.
251. Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, Newcomb PV, Savage P, Powell R, Rahamin J, Alderson D. Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* 1997;23:30-5.
252. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert HE. p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994;74:2218-23.
253. Friedlander P, Haupt Y, Prives C, Oren M. A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 1996;16:4961-71.
254. Daniel PT, Gillissen B, Sturm I. Tumour Genotype and Response to Cytotoxic Gene Therapy. In: Subramanian G, ed. *Manufacturing of Gene Therapeutics*: Kluwer Academic / Plenum Publisher, 2001:59-98.
255. Sturm I, Köhne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT. Analysis of the p53/Bax pathway in colorectal cancer: low Bax is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* 1999;17:1364-74.
256. McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Lowe SW. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2345-9.
257. Wagener C, Bargou RC, Daniel PT, Bommert K, Mapara MY, Royer HD, Dörken B. Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer* 1996;67:138-41.
258. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell* 1995;80:293-9.
259. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, Klosterhalfen B, Hauptmann S, Dörken B, Daniel PT. Bax expression in benign and malignant thyroid tumors: Dysregulation of wild type p53 is associated with a high Bax and p21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2001;92:805-11.

260. Torzewski M, Sarbia M, Heep H, Dutkowski P, Willers R, Gabbert HE. Expression of Bcl-X(L), an antiapoptotic member of the Bcl-2 family, in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:577-83.

8. Publikationen

1. Güner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dörken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigen analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer*. 2003, 103: 445-54
2. Güner D, Belka C, Daniel PT. Disruption of cell death signaling in cancer: Impact on disease prognosis and response to therapy. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003. 3: 319-26
3. Sturm I, Bosanquet AG Hermann S, Güner D, Dörken B, Daniel PT. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA damaging chemotherapy. *Cell Death Differ*. 2003, 10: 477-84
4. Hemmati PG, Gillissen B, von Haefen C, Wendt J, Stärck L, Güner D, Dörken B, Daniel PT. Adenovirus-mediated overexpression of p14ARF induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene*. 2002, 21: 3149-61

9. Danksagung

Danken möchte ich für die Unterstützung bei dieser Arbeit Dr. med. Isrid Sturm und Jana Rossius sowie auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, vor allem für das freundliche Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Peter Daniel.

Weiterhin möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder Aykut Güner sowie meinem Ehemann und meinen beiden Töchtern, Melina und Aylin, danken.

10. Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Dilek Güner

Berlin, den 5. Februar 2003